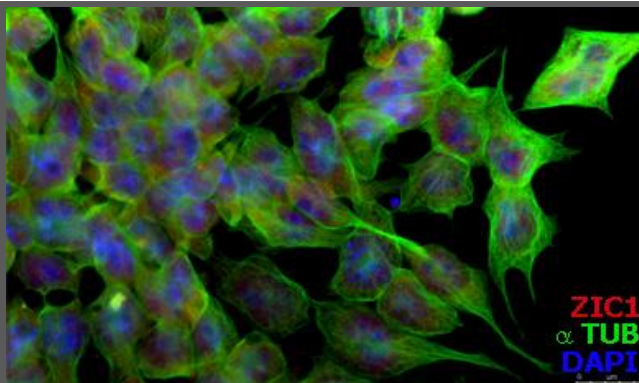


ESTUDIOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES POR EL ÓXIDO NÍTRICO

*Regulación de la expresión
del gen *Zic1* por altas
concentraciones de óxido
nítrico*



*Diseño y Optimización de un
medio de cultivo Químicamente
Definido suplementado con
bajas concentraciones de óxido
nítrico*



Presentada por:
Amparo Beltrán Povea

Dirigida por:
Dr. Juan R. Tejedo Huamán
Dra. Gladys M. Cahuana Macedo

Sevilla, 2016



Universidad Pablo de Olavide
*Biotecnología, Ingeniería
y Tecnología Química.*



CABIMER
*Departamento de
Medicina Regenerativa*

ESTUDIOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES POR EL ÓXIDO NÍTRICO

- ***Regulación de la expresión del gen Zic1 por altas concentraciones de óxido nítrico***
- ***Diseño y Optimización de un Medio de cultivo Químicamente Definido suplementado con bajas concentraciones de óxido nítrico***

Tesis doctoral para optar al título de Doctor

Presentada por:

Amparo Beltrán Povea

Dirigida por:

Dr. Juan R. Tejedo Huamán

Dra. Gladys M. Cahuana Macedo.

Sevilla, Marzo 2016



Universidad Pablo de Olavide

*Biotecnología, Ingeniería
y Tecnología Química.*



CABIMER

*Departamento de
Medicina Regenerativa*

Dr. Juan Rigoberto Tejedo Huaman, investigador del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), y Dra. Gladys Cahuana Macedo, investigadora del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER),

Certifican que:

El trabajo de investigación presentado por Doña **Amparo Beltrán Povea**, titulado “*Estudios sobre la regulación de la funcionalidad de las células pluripotentes por el óxido nítrico*” ha sido desarrollado bajo su dirección y supervisión en el departamento de Terapia celular y medicina regenerativa del CABIMER, y reúne los requisitos de calidad científica necesarios para ser defendido ante un tribunal para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

Y para que así conste y a efectos oportunos firman el presente informe en Sevilla a 01 de Marzo de 2016.

Dr. Juan R Tejedo Huaman
Macedo.

Dra. Gladys M. Cahuana

*“Si cada día coges un puñado de arena formarás
una montaña”*

Buda

A mi chico, familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral es un trabajo de investigación desarrollado, escrito y defendido por una persona con el fin de superar una meta más en su vida y hacer realidad el sueño de convertirse en doctor. Pero el resultado final es el trabajo de mucha más gente que de forma directa o indirecta ha aportado su granito de arena, haciéndose casi imposible resumir y plasmar con palabras la gratitud hacia todos ellos.

En primer lugar quiero dar las gracias a los investigadores principales de mi laboratorio, Juan Tejedo y Francisco Bedoya, por confiar en mí desde el primer momento y darme la posibilidad de desarrollar mi trabajo en su laboratorio y formarme profesionalmente. Llegué mi primer día a este laboratorio pensando que simplemente sería mi lugar de trabajo, pero las personas que lo componían no eran como en otro sitio, personas alegres positivas, con ganas de trabajar, ayudar y no rendirse nunca. Sin ni siquiera darme cuenta este laboratorio se convirtió en mi segundo hogar y mi segunda familia y marcó una segunda etapa en mi vida. Tengo que dar las gracias a “MR2 family” por formar parte de este proyecto tan importante en mi vida, porque esta tesis es el trabajo de todos nosotros, de nuestro apoyo y constancia. Gracias a mis compañeras de aventura, Carmen y Estefi, cuantas horas en ese laboratorio, como olvidarlo. Carmen casi diez años de amistad llevamos ya a nuestras espaldas, hemos recorrido tanto camino juntas y superado tantas metas desde que comenzamos la carrera que aun no me creo que llegue el momento de separarnos. Gracias por toda tu ayuda durante estos años y por hacerme ver las cosas más blancas cuando sólo las veía negras. Estefi, nuestra pequeña, mi cómplice en el cultivo de células humanas, gracias por tu ayuda, por esos domingos

y sábados que nos hemos turnado haciendo que así fuese más llevadero, te hemos dejado sola en el final de la aventura, pero estoy segura de que te irá genial. Rafa, como darte las gracias por todo, mi amigo, mi maestro, mi ejemplo, gracias por tus explicaciones, por tus horas dedicadas a enseñarme, por las largas tardes de discusiones y por tus grandes esquemas en la pizarra, gracias por no enseñarme sólo ciencia, sino también música, cultura y cocina. Gracias a los dos pilares fundamentales que hacen que este laboratorio se sustente, Ana e Irene, sin ellas esto no funcionaría, gracias por vuestro trabajo, vuestra profesionalidad, vuestra paciencia, por estar dispuestas siempre a ayudar, pero sobre todo gracias por vuestro positivismo, vuestra alegría, y por subirnos el ánimo siempre que lo hemos necesitado. Las tres hemos vivido tanto dentro como fuera del laboratorio, la “Alameda” siempre será nuestro barrio, nuestras idas y venidas en bici, nuestras tardes de compras y nuestras noches de cervezas y risas. Gracias también a Petri, Rafa, Álvaro, Laura, Rubén y Marcela, por formar parte de estas tardes y noches “Alamedenado”. Gracias en especial a Irene, por estar siempre ahí en los buenos y malos momentos, dentro y fuera del laboratorio, por escucharme y por darme siempre la razón, por inhibirnos con nuestras compras online, por convertirse en mi mejor amiga.

Gracias en general a todo el personal y técnicos de CABIMER que trabajan día a día para que personas como yo logremos nuestros objetivos. Gracias en especial a Merche, por el gran trabajo que hace en las salas de cultivo, por ser además una gran amiga, por su taconeo, su brillo y su arte. Como olvidar el trío citosina-guanina-uracilo, gracias Fanny porque a pesar de vernos pocas veces al año nuestra amistad es eterna. No puedo dejar de mencionar a mi cuñada Lourdes, mi amiga, mi profesora, mi consejera, la voz de mi conciencia, gracias por poder confiar siempre en ti

para todo, y gracias por tu hija Paola, la cual solo con mirarme hace que todo lo malo se olvide.

Gracias a toda mi familia, pero en especial a mis padres y mi hermana que lo son todo para mí, que sé que siempre estarán para ayudarme pase lo que pase. Tengo que agradecer a mi padre por centrar toda su vida en nosotras, por no decirme nunca la palabra NO y confiar siempre en mí, por enseñarme grandes valores de la vida y que con esfuerzo y trabajo todo se consigue. Gracias a mi madre por cuidarme, por ser un ejemplo de madre y mujer trabajadora, por ser una gran luchadora, y una gran persona. Gracias a mi mitad de locura, mi hermana, mi bicho, gracias por hacerme reír con tus chistes, por nuestras coca colas con patatas que me ayudaban a cargar las pilas después de largas horas de trabajo, por tus dulces que me endulzaban las tardes, por tus regalos sorpresas que me alegraban los días, por nuestras escapadas a la tienda de la esquina y por seguirme la corriente en mis ratos de estrés. Moro, mi perro, se merece estar aquí entre todos los demás, ya que ha sido mi fiel compañero, estando todas mis largas horas de estudio sin separarse de mí ni un solo minuto, gracias por tus miradas y lametazos que me aliviaban estos ratos eternos.

Dejo el último agradecimiento para el amor de mi vida, Ricardo, gracias por apoyarme en todas mis decisiones desde que nos conocimos, gracias por no soltarme nunca de la mano, gracias por dar cada salto juntos, por dejar etapas bonitas atrás para empezar otras mejores, por confiar siempre el uno en el otro, por aguantar mi estrés y mis cambios de humor, por el día a día juntos, porque aprendo de ti cada día, por hacerme reír, por tus miradas, gracias porque sé que darías todo por mí. Este último año ha sido difícil para nosotros pero juntos TODO ES POSIBLE.

Índice

ÍNDICE

Acrónimos y Abreviaturas.....	7
1. Introducción.....	9
1.1 Células madre.....	11
1.1.1 Definición.....	11
1.1.2 Tipos.....	11
1.2 Células madre embrionarias.....	14
1.2.1 Potencial Terapéutico.....	17
1.3 Células madre mesenquimales.....	18
1.3.1 Potencial Terapéutico.....	21
1.4 Diabetes.....	25
1.4.1 Complicaciones de la Diabetes.....	27
1.4.2 Terapia Celular de la Diabetes.....	29
1.4.2.1 Terapia celular de reemplazo de células beta en la Diabetes.....	29
1.4.2.2 Terapia celular de las complicaciones crónicas de la diabetes.....	32
1.5 Óxido Nítrico.....	33
1.5.1 Papel del NO durante el desarrollo.....	34
1.5.2 Efectos del NO dependiente de dosis.....	35
1.5.3 Diseños de protocolos de diferenciación basados en el NO.....	37
1.6 Marcador de diferenciación temprana Zic1.....	38
1.7 Medios químicamente definidos.....	39
1.7.1 Ventajas de medios libre de suero.....	42
1.7.2 Medios libre de suero comercialmente disponibles.....	44

1.8 Cultivo a gran escala	46
1.8.1 Ventajas del cultivo en biorreactores frente al cultivo en 2D	48
2. Hipótesis y Objetivos	51
2.1 Hipótesis	53
2.2 Objetivo General	54
2.3 Objetivos Específicos	55
3. Materiales y Métodos	59
3.1 Líneas de Células madre utilizadas	61
3.2 Cultivos celulares	61
3.3 Cultivo Celular en “SpinnerFlasks” y Biorreactores	63
3.4 Aislamiento ARN total y Transcripción Reversa	65
3.5 Caracterización Celular por PCR Cuantitativa en tiempo real y PCR Cualitativa	65
3.6 Extracción de proteínas e inmunodetección	66
3.7 Inmunocitoquímica	67
3.8 Ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina	69
3.9 Ensayos de pérdida y ganancia de función de Egr1	70
3.10 Construcción del plásmido de expresión Zic1 y transfección celular	71
3.11 Ensayos de Proliferación	71
3.11.1 Ensayos de Proliferación Celular por conteo	71
3.11.2 Ensayo de Proliferación Celular por Incorporación de BrdU	72
3.11.3 Ensayo de Proliferación Celular por Inmunocitoquímica	73
3.12 Ensayos de Morfología	74

3.13 Caracterización Celular por Citometría de flujo	74
3.14 Caracterización Celular: Potencial Multi-linaje	75
3.15 Análisis de la adherencia celular usando iCELLigence	76
3.16 Análisis estadístico	77
4. Resultados	79
Regulación de la expresión del gen Zic1 por altas concentraciones de Óxido Nítrico	
4.1 El NO incrementa la expresión de Zic1 en CME de ratón	81
4.2 Egr1 presenta un papel activador en la regulación de Zic1	83
4.3 Zic1 se expresa en células de islote pancreático	85
4.4 El tratamiento con NO modifica la vía de señalización de Shh en CMER	86
4.5 Posible papel de Zic1 en la inhibición de la vía Shh y proceso de diferenciación	88
Diseño y Optimización de un Medio de cultivo Químicamente Definido suplementado con bajas concentraciones de NO	
4.6 Estudio del efecto del NO y medios definidos sobre Células Madre Embrionarias de ratón (CMER)	91
4.7 Estudio del efecto del NO y medios definidos sobre Células Madre Embrionarias humanas (CMEh)	94
4.8 Estudio de un medio químicamente definido libre de suero sobre Células Madre Embrionarias humanas (CMEh)	97
4.9 Estudio del efecto del NO y medios definidos sobre Células Madre Mesenquimales de Tejido Adiposo (PCS500011)	102
4.9.1 Reducción de la concentración de suero fetal bovino	103
4.9.2 Estandarización de un medio químicamente definido libre de suero	107

4.9.3 Efecto del Óxido Nítrico en el medio químicamente Definido.....	113
4.9.4 Mejora de la adherencia celular.....	119
4.9.5 Aumento de la proliferación celular.....	120
4.9.6 Inhibición de la senescencia replicativa.....	121
4.9.7 Validación del Medio Químicamente Definido.....	127
4.10 Cultivo de la línea de Células Madre Mesenquimales de Médula Ósea (PCS500012) con el Medio Químicamente definido.....	130
4.10.1 Validación del Medio Químicamente Definido.....	136
4.11 Adherencia de las células mesenquimales de tejido adiposo a “microcarriers”.....	139
4.11.1 Cultivo en “SpinnerFlasks”.....	139
4.11.2 Cultivo en Biorreactores.....	143
5. Discusión.....	145
6. Conclusiones.....	163
7. Referencias.....	167
8. Publicaciones.....	185
Anexo.....	189

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridina
HCOR	Hidrocortisona
VTN	Vitronectina
NO	Óxido Nítrico
DETA- NO	Dietilentriamina-NO
CM	Célula madre
CMA	Célula madre adulta
CMM	Celulas madre mesenquimales
CME	Células madre embrionaria
CMPi	Células madre pluripotentes inducidas
CMC	Células madre cancerígenas
MCI	Masa celular interna
LIF	Factor inhibidor de leucemia
GFP	Proteína verde fluorescente
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Transcripcion reversa-PCR
SDS- PAGE	SDS- gel de electroforesis de poliacrilamida
Chip	Inmunoprecipitación de cormatina
Shh	Sonic hedgehog
SFB	Suero fetal bovino
MQD	Medio químicamente definido
HG	Alto en glucosa
LG	Bajo en glucosa

1. Introducción

1.1 Células madre

1.1.1 Definición

Podemos definir las células madre como células presentes en todos los organismos multicelulares que no poseen las características fenotípicas de ningún tejido adulto, pero que son capaces de generar *de novo* células diferenciadas de los tipos celulares existentes en los tejidos. Estas células tienen la capacidad de dividirse mediante mitosis, diferenciarse en diversos tipos celulares especializadas y autorrenovarse para producir más células madre. Existen diversos tipos de células madre y todas ellas deben presentar las siguientes propiedades comunes: expresión de marcadores de pluripotencia, activación de vías de señales de transducción que mantienen el estado “stem”, un estado proliferativo característico, comportamiento *in vitro* de las CMs pluripotentes, y comportamiento *in vivo*. Gracias a estas propiedades y sus capacidades regenerativas únicas, las células madre ofrecen un gran potencial para el tratamiento de diversas patologías utilizando procedimientos de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa en general.¹

1.1.2 Tipos

Las células madre se pueden clasificar en cuatro tipos definidos, dos fisiológicos presentes en diferentes etapas de la vida, las células madre embrionarias (CMEs) y las células madre adultas

(CMAs); uno inducido que son las células madre pluripotente inducidas (CMPi); y uno patológico, las células madre cancerígenas (CMCs) que presentan algunas propiedades “stem”.¹

Las células madre embrionarias son células derivadas de la masa celular interna (MCI) del blastocisto, y presentan la capacidad de crecer indefinidamente, como se muestra en la figura 1. Estas células existen *in vivo* durante un corto periodo del desarrollo del embrión, en paralelo con la división mitótica. Son obtenidas mediante dispersión enzimática de la MCI y cultivadas bajo condiciones particulares. Las CMEs resultantes poseen la capacidad no sólo de autorenovarse, sino también de mantener la pluripotencia y de diferenciarse hacia las tres capas germinales. Las células madre epiblasticas pluripotentes (EpiCM o EpiSC-en ingles) derivadas del epiblasto embrionario son un subtipo de CME, pero difieren en su estado epigenético y no son completamente pluripotentes. Las CMEs humanas podrían suponer una alternativa para el tratamiento de enfermedades como el Parkinson, daños en la espina dorsal y la diabetes, lo cual está siendo profundamente estudiado, teniendo en cuenta el impacto que supone el uso de estas células para el trasplante en pacientes.^{1,2}

Las células madre adultas se encuentran en organismos desarrollados y poseen dos propiedades principales, la capacidad de dividirse y crear otra célula igual a sí misma, y la de dividirse para crear una célula diferente de sí misma (Figura1). Estas células raras y generalmente escasas, son mayormente quiescentes y están contenidas en nichos especializados del cuerpo. Se pueden

encontrar en una serie de tejidos como medula ósea, tejido adiposo, intestinos y piel, donde sirven para reemplazar a aquellas células perdidas por daño, desgaste o recambio natural. El uso de células madre adultas en investigación y terapia es mucho más prometedor que el de células madre embrionarias, dado que no se requiere la destrucción de un embrión para su obtención, y se minimiza el riesgo de rechazo ya que en algunos casos se pueden obtener a partir del destinatario.^{1,3}

Dadas las dificultades éticas en el uso de células madre embrionarias y el riesgo de rechazo de las mismas, surge la necesidad de generar células pluripotentes directamente de las propias células del paciente. La hipótesis de plasticidad celular propone que al igual que una célula pluripotente es capaz de diferenciarse hacia una célula somática, ésta también puede volver a convertirse en una célula madre, a la que se conoce como célula madre con pluripotencia inducida (CMPi)¹. Las células somáticas pueden ser reprogramadas mediante la transferencia del contenido de sus núcleos en oocitos o mediante la fusión con células embrionarias, lo que indica que los huevos no fertilizados y las células ES contienen factores que pueden conferir totipotencia o pluripotencia a las células somáticas^{4,5}. En 2006, Yamanaka *et al.* fueron capaces de generar células madre pluripotente inducidas, directamente a partir de cultivos de fibroblastos de ratón adulto².

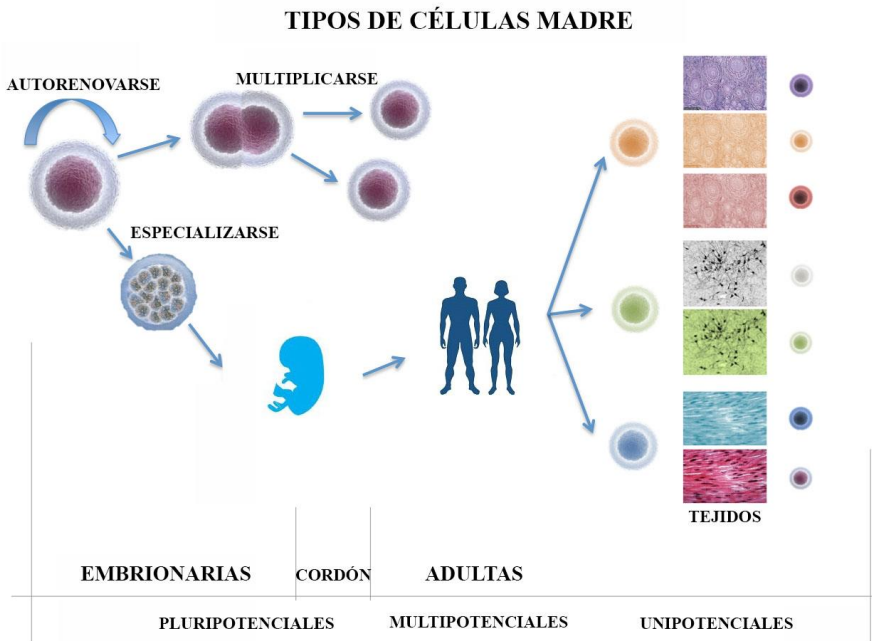


Figura 1. Tipos de células madre. Células madre embrionarias, procedentes de la masa celular interna del blastocisto; y células madre adultas, procedentes de diversos tejidos del adulto, como médula ósea o tejido adiposo. Ambas pueden dar lugar a tipos celulares de diferentes tejidos mediante protocolos de diferenciación específicos y podrían ser usadas para regeneración de tejidos dañados.

1.2 Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (CME) son células con capacidad pluripotente y de autorenovación derivadas de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo. La pluripotencia es la capacidad de una célula de generar todas las líneas celulares del desarrollo y del organismo adulto; y la autorenovación es la capacidad de una célula de proliferar en el mismo estado ⁶. Por tanto, las CME procedentes de embriones pre-implantados poseen el potencial de diferenciarse hacia cualquier tipo celular derivado de las tres capas

germinales, ectodermo (tejidos epidérmicos y nervios), mesodermo (músculo, hueso y sangre) y endodermo (hígado, páncreas, tracto gastrointestinal, y pulmones), incluyendo células fetales y adulta (Figura 2). Estas células por sí mismas no dan lugar a un feto o animal adulto, ya que no retienen el potencial para constituir los tejidos extraembrionarios, e *in vitro* carecen de las señales esenciales para el desarrollo *in vivo*. La base de la pluripotencia reside en vías de regulación conservadas compuestas por numerosos factores de transcripción y múltiples cascadas de señalización. Así, estas vías de regulación mantienen las CME en un estado pluripotente y no diferenciado mientras que alteraciones de estas señales promueven la diferenciación.^{6,7}

El estado de pluripotencia es mantenido *in vitro* gracias a una variedad de factores de transcripción, entre los que destaca el núcleo de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog. Oct4 y Nanog fueron identificados como los reguladores principales mostrando que son esenciales para el mantenimiento del estado pluripotente (Figura 2). Oct4 funciona como un heterodímero con Sox2, emplazando así a Sox2 entre los reguladores principales, siendo esta cooperación fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia celular y prevención de la diferenciación del trofoblasto y la formación poliploide en CME. Sox2 regula la expresión del gen *fgf4* con Oct4, y recientemente se ha encontrado que el núcleo constituido por Sox2, Oct4 y Nanog activa genes críticos para la autorrenovación y reprime genes que promueven la diferenciación, controlando así la pluripotencia de las CME. Nanog promueve un estado indiferenciado

estable. Además, muchos otros factores de transcripción parecen mantener la pluripotencia de las CME, entre ellos c-Myc, Rex1, B-Myb, Foxd3, Gbx2, UTF1, Fgf4, Pem, Sall4, Zic3 y Zfx.⁶⁻⁸ Es necesario entender dos conceptos fundamentales en la función del núcleo de factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog en CME: en primer lugar, dicho núcleo regula positivamente sus propios promotores, formando un bucle interconectado de autoregulación. En segundo lugar, los factores de núcleo co-ocupan y activan la expresión de los genes necesarios para mantener el estado de las CME, contribuyendo a la represión de genes que codifican factores de transcripción que promueven la diferenciación.⁶

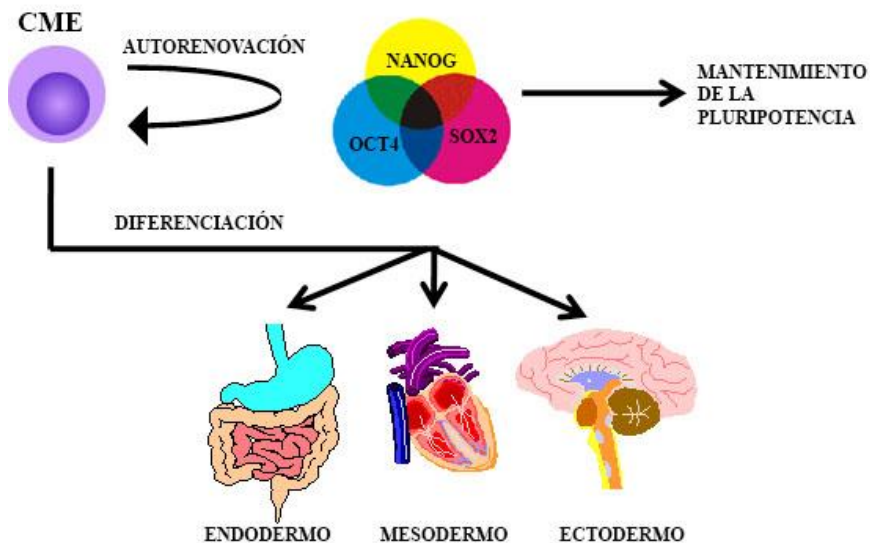


Figura 2. Regulación de la pluripotencia de las CME. El núcleo constituido por los factores de transcripción Oct4, Nanog y Sox2 son los responsables del mantenimiento de la pluripotencia y autorenovación de las CME, y represión de genes de diferenciación. Bajo un protocolo de diferenciación, estas células poseen el potencial de diferenciarse hacia cualquier tipo celular derivado de las tres capas embrionarias, ectodermo, mesodermo y endodermo.

1.2.1 Potencial Terapéutico

Defectos durante el proceso de desarrollo puede causar diferentes tipos de enfermedades, con lo que la mejora del entendimiento de los mecanismos de control en células pluripotentes podría permitir nuevas terapias para estas enfermedades ⁶.

Gracias a su capacidad de diferenciación *in vitro*, las CME han mostrado claramente que poseen el potencial para generar células multipotentes y células progenitoras capaces de diferenciarse hacia un número limitado de destinos, las cuales podrían ser terapéuticamente viables ⁸. Las CME humanas son capaces de diferenciarse hacia todos los tipos celulares presentes en el humano adulto, razón por la cual se pueden considerar una fuente de células o tejidos que podrían emplearse en enfermedades cuyas células nativas sean no funcionales o destruidas. Sin embargo, el uso de estas células presenta varios inconvenientes e implicaciones éticas relacionadas con el uso de embriones. Dado que estas células suponen una fuente ilimitada de tejidos para tratamientos basados en trasplantes, los últimos estudios se están centrando en desarrollar métodos de cultivo para las mismas e inducir su diferenciación hacia tipos celulares específicos ⁹.

1.3 Células madre adultas mesenquimales

Las células madre adultas mesenquimales (CMM), fueron aisladas por primera vez a partir de médula ósea por Fridenshtein *et al.*¹⁰. Posteriormente, se han obtenido células madre mesenquimales con características biológicas similares a partir de otros órganos, tales como sangre periférica, sangre fetal, sangre del cordón umbilical, huesos trabeculares, tejido conectivo del músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, membrana sinovial y dientes deciduos. Los estudios existentes apoyan la hipótesis de que las células madre mesenquimales constituyen una gran red en el cuerpo y son continuamente reemplazadas por células madre mesenquimales de médula ósea¹¹⁻¹⁴.

La figura 3 refleja una descripción de las células madre mesenquimales, las cuales se pueden definir como células madre clonogénicas, no hematopoiéticas, procedentes de múltiples tejidos, que se caracterizan por su fácil aislamiento, por su similitud en sus fenotipos y por presentar la capacidad de diferenciarse hacia tipos celulares multilíneaje, incluyendo osteoblastos, condrocitos, células endoteliales, e incluso células neuronales. Estas características convierten a las células madre mesenquimales en el primer candidato para ser introducido en la clínica¹⁵.

A lo largo de los años se han descrito múltiples métodos para su aislamiento. Uno de los métodos se basa en la adherencia selectiva a superficies plásticas^{16,17}. Otros investigadores desarrollaron un anticuerpo monoclonal que les permitió aislar una población celular pura con características de células madre mesenquimales.

Adicionalmente, han reportado la obtención de células progenitoras adultas multipotentes (MAPC-MultipotentAdult Progenitor Cells), descritas como células madre mesenquimales pluripotentes que fueron aisladas a partir de la fracción celular mononuclear derivada de médula ósea con CD45/Glicoproteína ausente, las cuales selectivamente se adhirieron a placas cubiertas con laminina en condiciones bajas en suero ¹⁸. Por último, se aisló una población a partir de médula ósea en función de su exclusión del colorante Hoechst, generando células madre mesenquimales ¹⁹.

En general, las células madre mesenquimales son poblaciones heterogéneas, que contienen células progenitoras en diferentes estadios de maduración. El proceso de selección y la calidad celular de los preparados celulares se ven dificultados por esta heterogeneidad, junto con el uso de diferentes tejidos como material de inicio y la existencia de múltiples protocolos de aislamiento y cultivo. Con la finalidad de solventar este problema, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha definido los siguientes criterios mínimos para considerar una célula como célula madre mesenquimal: i.- adherencia a superficies plásticas de cultivo celular acompañado por un fenotipo fibroblastoide ²⁰, ii.- expresión y no expresión de marcadores fenotípicos de superficie y iii.- capacidad de diferenciarse hacia múltiples tipos celulares mesodérmicos, como los linajes osteocito, adipocito y condrocito ²⁰⁻²³. Además, actualmente existen estudios que indican que las CMM pueden diferenciarse hacia un número de tipos celulares no mesodérmicos ^{24,25}. Sin embargo, un gran número de estudios relacionados principalmente con la calidad del proceso de expansión *in vitro*, muestran que estos criterios no son

suficientes para caracterizar las CMM. Por esta razón, en 2013 la ISCT propuso que además de los criterios mínimos establecidos en 2006 es necesario caracterizar la actividad inmunomoduladora de las mismas ²⁶. Múltiples estudios acerca de los marcadores de superficie característicos de las CMMs coinciden en que estas células presentan una expresión negativa para los marcadores de superficie hematopoyéticos: CD34, CD45, CD14, CD31, CD133, HLA-DR; y una expresión positiva para CD73, CD90, CD105, CD166, CD54, CD55, CD13 and CD44 ^{20,27}.

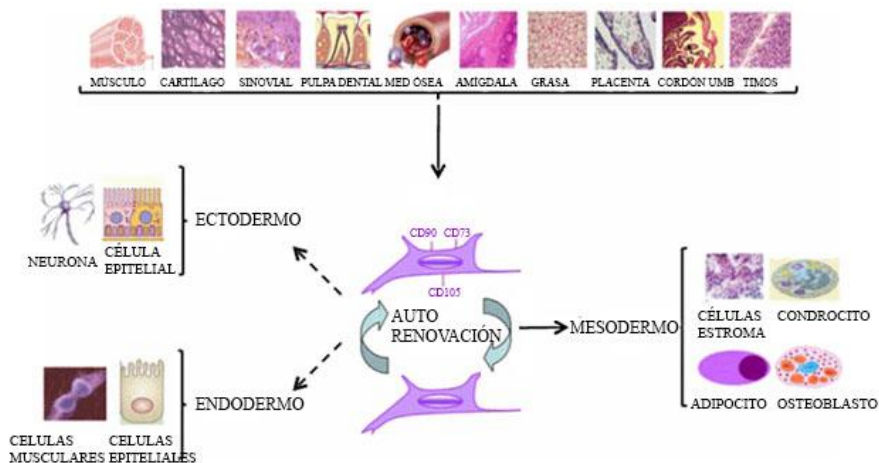


Figura 3. Propiedades de las Células Madre Mesenquimales. Las células madre se caracterizan por su fácil aislamiento, dado que pueden obtenerse de multitud de tejidos, como músculo, cartílago, médula ósea, placenta, cordón umbilical, entre otros. Presentan la capacidad de diferenciarse hacia tipos celulares de las tres capas germinales, incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales, e incluso células neuronales.

1.3.1 Potencial Terapéutico

La Medicina Regenerativa es un campo muy amplio que está en continuo crecimiento y cuyo objetivo principal no es sólo tratar, sino curar una gran variedad de enfermedades, principalmente enfermedades degenerativas y relacionadas con la edad. Para conseguir este objetivo, la medicina regenerativa ofrece terapias basadas en células, siendo las células madre en general, y las células madre mesenquimales en particular, los candidatos ideales para el uso en estos protocolos terapéuticos, gracias a su seguridad, capacidad de expandirse múltiples veces, crecimiento versátil, son hipo-inmunogénicas (no expresan HLA-DR), potencial de diferenciación, y pueden reparar o regenerar tejidos.

En la actualidad, hay un gran interés en el entendimiento de la biología de las CMM para su potencial uso clínico, ya que recientemente se han llevado a cabo significantes progresos con múltiples ensayo clínicos dirigidos a tratar una variedad de enfermedades humanas, como cáncer, diabetes, hueso, cartílago, corazón, gastrointestinal, inmune y enfermedades neurodegenerativas ^{15,28,29}. Recientemente, se han reportado más de 826 ensayos clínicos con CMM, siendo la mayoría de ellos terapias exitosas, donde los datos clínicos y preclínicos no muestran efectos adversos tras la aplicación de CMM, sugiriendo que éstas pueden ser aplicadas de forma segura ²⁰. La tabla 1 muestra algunos de los ensayos clínicos con CMMs en España inscritos en “Clinical Trails.gov” del Instituto Nacional de la Salud (NIH) de los Estados

Unidos. A continuación se describen algunos de los últimos ensayos, cuyas terapias requieren altas dosis de CMMs:

- Enfermedad de Crohn's: Se ha reportado un estudio en el que la infusión celular de dos dosis de CMMs autólogas derivadas de médula ósea redujeron el índice de actividad de la enfermedad de Crohn's en fase I. En fase II, después de 9 días de la inyección de CMM, se observó una reducción de inflamación intestinal y ulceración en pacientes. Sorprendentemente, alrededor del día 28 todos los pacientes mostraron una drástica disminución en la severidad de la enfermedad, indicando que las CMM podrían ser una herramienta para el tratamiento de esta enfermedad ³⁰.
- Enfermedad aguda de injerto contra huésped (GVHD): Un estudio ha publicado que las células CMM humanas han sido usadas para tratar de novo la enfermedad GVHD, comprobando que en los pacientes que fueron infundidos con altas dosis celulares, la mayoría de los síntomas desaparecían alrededor del día 18, sin daños ni desarrollo de tejido ectópico, mostrando así la notable capacidad de las CMMs para tratar esta enfermedad ³¹.
- Regeneración de cartilago: Se ha realizado un ensayo sobre el tratamiento de Osteoartritis mediante el uso de CMM autólogas derivadas de médula ósea, donde los pacientes fueron inyectados con CMM en los daños del cartílago articular situados en las articulaciones de las rodillas. En los pacientes trasplantados con CMMs se observó que los daños fueron cubiertos con un tejido

blanco y suave, presentando una mejora en las propiedades artroscópicas e histológicas en comparación con el grupo control libre de CMM. Estos resultados positivos convierten a las CMMs en una promesa para la reparación de cartílago ³².

- Regeneración de hueso: Pacientes que padecen Osteogénesis Imperfecta (OI) pueden ser tratados mediante el trasplante con células de médula ósea a partir de hermanos HLA-idénticos. Ensayos más recientes han mostrado que CMM fetales alogénicas pueden ser injertadas y diferenciarse hacia hueso en fetos humanos con OI severa, incluso cuando el receptor es inmunocompetente y HLA-incompatible ³³, demostrando así la importancia de las CMMs en la regeneración de hueso.

- Regeneración de Miocardio: se ha mostrado que la introducción intra-coronaria de CMMs autólogas de médula ósea reduce las zonas dañadas del corazón y mejora la contractilidad y la función del mismo. Ello demuestra la posibilidad de usar CMMs en terapias de regeneración de miocardio ³⁴.

- Leucodistrofia Metacromática (MLD): MLD o enfermedad de Hurler's, se trata de una enfermedad caracterizada por severos desórdenes esqueléticos y neurológicos. Se ha realizado un ensayo trasplantando pacientes que padecen dicha enfermedad con CMM de médula ósea, presentando el 70% de los pacientes una notable mejoría en la velocidad de conducción nerviosa y en la densidad mineral del hueso. Además, es importante resaltar que no se detectaron efectos adversos en ningún paciente tras la infusión ³⁵.

Por tanto, la infusión con CMMs alogénicas aparece como una nueva alternativa para tratar pacientes con MLD.

Tabla 1. Ensayos clínicos CMMs en España (NIH clinical trials)

Enfermedad	Patología	Posología	Dosis celular	Estado experimental
Cardiovascular	Miocardiopatía dilatada	Inyección transendocardial	$30-40 \cdot 10^6$ CMM	Ensayos (fases 1 y 2)
	Isquemia crítica del miembro inferior	Inyección intraarterial e intramuscular	$1 \cdot 10^6$ CMM/kg	Completado (fases 1 y 2)
Osteoarticular/ Degenerativas	Osteonecrosis de la cabeza femoral	Inyección intrarticular	$50 \cdot 10^6$ CMM	Ensayo (fase 1)
	Osteoartritis de rodilla	Inyección intrarticular	$40 \cdot 10^6$ CMM	Completado (fases 1 y 2)
	Osteogenesis Imperfecta	Inyección intrarticular		Ensayo (fase 1)
	Artritis reumatoide aguda	Inyección intravenosa	De $1-4 \cdot 10^6$ de CMM/kg	Completado (fases 1 y 2)
	Degeneración de disco Intervertebral	Inyección Intradiscal	$25 \cdot 10^6$ CMM	Ensayo (fases 1 y 2)
Autoinmune	Enfermedad aguda injerto contra huésped	Infusión intravenosa	$0,7 \cdot 10^6$ CMM/kg	Completado (fases 1 y 2)
	Esclerosis Múltiple	Infusión intravenosa	$4 \cdot 10^6$ CMM/kg	Completado (fases 1 y 2)
	Lupus Eritematoso		$80-100 \cdot 10^6$ CMM	Completado (fases 1 y 2)

	Enfermedad de Chron	Inyección intravenosa	$120 \cdot 10^6$ células	Completado (fase 3)
Neurodegenerativa	Daños en la espina dorsal	Inyección local	$100 \cdot 10^6$ CMM	Ensayo (fase 1)
Enfermedad	Patología	Posología	Dosis celular	Estado experimental
Respiratoria	Fibrosis Pulmonaria Idiopática	Infusión endobronquial		Ensayo (fase 1)
	Fístula post-radioterapia	Infusión local	$5 \cdot 10 \cdot 10^6$ células	Ensayo (fase 1)
Urología	Incontinencia urinaria femenina	Aplicación local	$5 \cdot 10 \cdot 10^6$ CMM	Ensayo (fase 2)
Enfermedad Hepática	Enfermedad Hepática crónica	Infusión local	$100 \cdot 200 \cdot 10^6$ CMM	Ensayo (fase 1)
	Cirrosis alcohólica	Infusión local	$100 \cdot 200 \cdot 10^6$ CMM	Ensayo (fase 1)
Hematooncología	Trasplante de médula ósea	Implante CMM		Ensayo (fase 1)

1.4 Diabetes

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por una hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina que afecta alrededor de 347 millones de la población mundial ³⁶. Debido a las dietas con altas grasas y azúcares acompañados de un estilo de vida sedentario se estima que este número aumente a 439 millones de adultos para el año 2030 ³⁷. Estos altos niveles de glucosa en sangre son responsables de severas complicaciones crónicas como retinopatía, ceguera, insuficiencia renal

crónica, neuropatía, amputación de extremidades y enfermedad cardiovascular³⁶⁻³⁹.

La diabetes se puede clasificar en tres tipos principales:

- Diabetes Tipo 1, también conocida como diabetes juvenil, aparece entre el 5 y 10% de los casos, y se caracteriza por la destrucción de células beta, normalmente mediante un mecanismo autoinmune mediado por las células T, que a menudo provoca una deficiencia absoluta de insulina en el cuerpo necesaria para el metabolismo de la glucosa.³⁷⁻³⁹
- Diabetes Tipo 2, que supone el 80-90% de los casos y se caracteriza por una falta relativa de insulina, lo que impide metabolizar correctamente la glucosa provocando una hiperglucemia. Normalmente está ligada a la obesidad, pudiendo generar resistencia a insulina. A pesar de que los mecanismos patogénicos son diferentes, la diabetes tipo 1 y 2 poseen síntomas comunes incluyendo la intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, hiperlipidemia y otras complicaciones.³⁷⁻³⁹
- Diabetes Gestacional, es diagnosticada en torno al 5-10% de las mujeres embarazadas. Suele aparecer durante el segundo trimestre de gestación causando altos niveles de glucosa en sangre y desaparece tras el nacimiento del bebé, afectando tanto al bebé como a la madre. Es incontrolable, pudiéndose reducir su efecto mediante ejercicio, una dieta adecuada y la medicación necesaria.³⁸

Actualmente, la principal estrategia para disminuir los niveles de glucosa en sangre en la diabetes se basa en la administración de insulina exógena o tratamientos farmacológicos con hipoglucemiantes. Estos tratamientos son efectivos en reducir la hiperglucemia, pero no son capaces de mimetizar por completo la secreción de insulina endógena llevada a cabo por las células beta pancreáticas, de modo que en ocasiones puede genera un coma hipoglucémico. En el caso de la diabetes tipo 1, caracterizada por la destrucción autoinmune de las células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos, un tratamiento más definitivo es el trasplante del páncreas o de los islotes pancreáticos. Sin embargo, la escasa disponibilidad de donadores y el alto costo del procedimiento limitan la adopción de esta terapia ^{36,38}. Por tanto, estrategias que promuevan la expansión de las células beta existentes en el organismo, o el suministro de células productoras de insulina derivadas de células madre supondrían futuros tratamientos para pacientes diabéticos.

1.4.1 Complicaciones de la Diabetes

La diabetes es una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad en el mundo y es responsable de alteraciones metabólicas, hormonales y fisiológicas en el organismo, dando lugar a un número de complicaciones crónicas ^{37,38}. Dichas complicaciones están ampliamente agrupadas en:

- Complicaciones macrovasculares: son el resultado de una hiperglucemia crónica y están asociadas a factores de riesgo

cardiovascular, afectando a las arterias que suministran al corazón, el cerebro y las extremidades inferiores. La complicación macrovascular más grave incluye la enfermedad cardiovascular acelerada, resultando en un mayor riesgo de enfermedad de la arteria coronaria, de la arteria periférica, de infarto de miocardio, y amputación de extremidades.^{37,40}

- Complicaciones microvasculares: se trata de complicaciones resultantes de daños en pequeños vasos sanguíneos como consecuencia de una hiperglucemia. Las complicaciones microvasculares se clasifican en retinopatía o complicaciones oculares, nefropatía o fallos renales, y neuropatía o daños en los nervios periféricos, siendo estas complicaciones características de todas las formas de diabetes. Como consecuencia de ello, la diabetes es la principal causa de ceguera, de enfermedad renal, y de una variedad de neuropatías debilitantes.^{37,40}

Además existen una gran cantidad de complicaciones secundarias asociadas con la diabetes, entre las que se incluyen úlceras en pie diabético, cardiomiopatías, depresión, disfunción eréctil, aumento del riesgo de fractura y alteración de la cicatrización ósea, y manifestaciones cutáneas.³⁷

1.4.2 Terapia Celular de la diabetes

Debido al alto número de pacientes diabéticos existentes en todo el mundo y a que el método tradicional de administración de insulina exógena no es suficiente y a menudo causa hipoglucemia letal, se están llevando a cabo grandes avances en los estudios terapéuticos con el fin de desarrollar nuevas estrategias que contemplen el uso de células. Las terapias celulares de la diabetes pueden ser agrupadas en dos grandes propuestas: i.- terapia celular de reemplazo de las células beta destruidas y ii.- terapia celular de las complicaciones crónicas.

1.4.2.1 Terapia celular de reemplazo de células beta en la Diabetes

El tratamiento definitivo para la cura de la diabetes y el cual se lleva estudiando desde hace más de 40 años es el trasplante del páncreas, o en su lugar el trasplante de islotes lo cual requiere una cirugía menos invasiva dado su pequeño tamaño. Sin embargo, existe un problema fundamental en este tratamiento, y es la escasez de donantes de islotes humanos, siendo normalmente necesarios dos donantes para trasplantar un paciente. Por tanto, existe un gran interés en encontrar una fuente alternativa de islotes.⁴¹

Recientes investigaciones en la regeneración de células productoras de insulina han revelado que estas células pueden ser derivadas de múltiples fuentes, incluyendo células madre embrionarias, adultas, mesenquimales y hematopoyéticas, a

través de procesos de proliferación, diferenciación, neogénesis, reprogramación nuclear y trans-diferenciación ³⁸. Las células beta productoras de insulina pueden ser restauradas mediante el reemplazo por nuevas células, la reprogramación de otros tipos de células en células beta, y la regeneración de nuevas células beta a partir de las restantes células sanas. Así, las células madre se presentan como futura terapia para el tratamiento de la diabetes y enfermedades asociadas.

Las células madre embrionarias presentan el mayor potencial de diferenciación hacia células productoras de insulina ^{39,40}. Soria *et al.* fueron los primeros en diferenciar CME de ratón hacia células productoras de insulina y observar que las células diferenciadas y trasplantadas en ratones diabéticos revertían la hiperglucemia ⁴². Sin embargo, otros estudios similares mostraron que estas células no eran capaces de sintetizar insulina exclusivamente en respuesta a altos niveles de glucosa, lo cual requiere más estudios ^{43,44}. Además, debido a cuestiones éticas y legales, y a la formación de teratomas, las células madre embrionarias suponen un desafío para convertirse en una solución clínicamente viable ³⁶.

Recientemente, las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, sangre y tejido de cordón umbilical, conducto pancreático y tejido adiposo han mostrado una gran capacidad para diferenciarse hacia células productoras de insulina, lo que abre una puerta para conseguir un tratamiento alternativo eficaz para la diabetes tipo 1 ^{36,45}. Existen numerosos estudios que apoyan esta hipótesis. Zhang

et al. mostraron que las células aisladas de páncreas fetal humano poseían las características de células progenitoras pancreáticas, con un alto potencial de proliferación y capacidad para diferenciarse *in vitro* hacia células productoras de insulina ⁴⁶. Huang *et al.* probaron que tras la diferenciación estas células similares a las del islote manifestaron la capacidad de revertir la hiperglucemia en ratones diabéticos ⁴⁷. Otro grupo aisló células madre de ducto pancreático humano adulto, las cuales no sólo expresaban nestina y PDX1, sino que presentaban los marcadores idénticos de las CMMs ⁴⁸. La médula ósea es una importante fuente de obtención de células madre adultas, y su trasplante es considerado un tratamiento efectivo para la diabetes tipo 1. Ianus *et al.* demostraron que las células derivadas de médula ósea de ratón podían diferenciarse hacia células β pancreáticas, con dependencia de glucosa y secreción de insulina mejorada cuando se trasplantaba en ratones ⁴⁹. Chan *et al.* y Wu *et al.* aislaron CMMs de médula ósea de rata e indujeron con éxito su diferenciación hacia células como islotes, cuyo trasplante además alivió la hiperglucemia en ratas diabéticas ^{50,51}. Oh *et al.* sugirieron que células madre derivadas de médula ósea de rata cultivadas en una alta concentración de glucosa podían diferenciarse hacia células productoras de insulina, expresando genes pancreáticos como insulina, glucagón y somatostatina y favoreciendo la normalización de glucosa en sangre en ratones trasplantados ⁵². Esto también fue demostrado por Xie *et al.* a través de un protocolo de diferenciación basado en la adición

final de Activina A ⁵³. Sun *et al.* demostraron que CMMs procedentes de pacientes diabéticos podían diferenciarse *in vitro* hacia células productoras de insulina bajo las condiciones apropiadas, siendo una evidencia directa del uso de CMMs de médula ósea propias del paciente como fuente de células productoras de insulina para terapias de reemplazo de células beta ⁵⁴. Las CMMs procedentes de tejido adiposo y de sangre del cordón umbilical presentan fenotipos muy similares a las de médula ósea, con lo que se presentan como fuentes alternativas de células β pancreática ⁵⁵⁻⁵⁷.

1.4.2.2 Terapia celular de las complicaciones crónicas de la diabetes.

La aplicación de terapias celulares para el tratamiento de las complicaciones relacionadas con la diabetes sí podrá ser aplicada a corto plazo, ya que actualmente se están llevando a cabo multitud de ensayos clínicos. Dichos ensayos implican el uso de células troncales adultas para tratar de revertir el daño vascular producido en ojos, riñones y miembros en pacientes diabéticos.

Múltiples estudios han descrito los efectos de la terapia con CMM en neuropatía diabética experimental, donde las CMM de tejido adiposo ya han sido aplicadas en enfermedades cardiovasculares como infarto agudo de miocardio, cicatrización de heridas de úlceras en la piel, o cirugía plástica como mamoplastia y reparación facial. Se ha descrito que las células madre pueden mejorar la neuropatía diabética mediante

dos caminos, permitiendo la expresión de factores neurotróficos locales, y el injerto y diferenciación de los tejidos constituyentes hacia los tejidos diana ⁵⁸. Dado su capacidad de autorenovación y diferenciación, las CMMs se han convertido en una importante área de estudio en la regeneración de tejidos y medicina regenerativa para el tratamiento de úlceras de pie diabético, una significativa complicación de la diabetes asociada a la polineuropatía diabética que afecta altamente a la calidad de vida ^{58,59}. Importantes ensayos clínicos implican el uso de células madres autólogas aisladas de médula ósea para el tratamiento de retinopatía como consecuencia de la diabetes. Por otro lado, CMM alogénica de médula ósea también han sido usadas en trasplantes, con el inconveniente de que presentan una menor eficacia debido a la eliminación de las células por el sistema inmune del destinatario ⁶⁰. La limitación de la terapia con CMM alogénicas también puede estar relacionada con la disminución de factores neurotróficos liberados por las células trasplantas, así como el incremento del riesgo de formación de tumores ⁶⁰.

1.5 Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre de vida corta sintetizado a través de la vía L-arginina a L-citrulina, la cual es catalizada por las óxido nítrico sintasas (NOS). En la mayoría de las células animales se han descrito tres tipos generales de NOS: NOS1

(NOS neuronal), NOS2 (NOS inducible) y NOS3 (NOS endotelial) ⁶¹. El NO reacciona con moléculas como el oxígeno, superóxido o metales, ácidos nucleicos y proteínas. El NO se oxida rápidamente hacia nitrato y nitrito, los cuales son considerados productos no inertes, ya que son una fuente de NO a través de su reducción por las enzimas reductasas cuando la vía L-arginina/NOS es disfuncional ⁶². Además de actuar como germicida en respuestas inflamatorias del sistema inmune y como neurotransmisor en el sistema nervioso central, el NO actúa como segundo mensajero y posee múltiples efectos biológicos implicados en numerosas funciones fisiológicas en mamíferos, como la regulación de la presión sanguínea a través de la relajación del músculo liso y la inhibición de la agregación plaquetaria ⁶³⁻⁶⁵. Además, se ha demostrado que juega un papel en el crecimiento, supervivencia, proliferación, diferenciación, así como en la patología de enfermedades como el cáncer, la diabetes y enfermedades neurodegenerativas ^{66,67}. Se ha demostrado que el NO tiene un importante papel como regulador de múltiples funciones fisiológicas, convirtiéndose así en una diana de estudio en el campo del metabolismo, pluripotencia y diferenciación de células madre.

1.5.1 Papel del NO durante el desarrollo

La acción del NO puede ser dependiente o independiente de la mediación de la guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) ^{68,69}. Se conoce que el NO interacciona con complejos metales, oxígeno o superóxido, siendo esta acción independiente del cGMP, y dependiente de la cantidad de NO ⁷⁰. En el caso de los efectos del

NO dependientes de GMPc, son mediados por la Guanilato Ciclasa soluble (sGC), que se considera como una enzima receptora del NO y tras ser activada por el NO cataliza la conversión de GTP a cGMP, el cual controla algunos efectos fisiológicos en múltiples tejidos ⁶⁸. Tras estos y otros múltiples estudios se comprobó que la señalización NO/GMPc juega un papel significativo en el desarrollo embrionario y la diferenciación celular ^{69,71,72}. Aunque no está claro si la acción del NO en la biología de células madre está mediada por la vía GMPc, estudios demuestran que la pluripotencia y diferenciación en CME son independientes de la misma ⁶⁴, concretamente se ha encontrado que efectos del NO en la multipotencia y diferenciación de células madre de médula ósea son independientes de la vía sGC-GMPc ^{73,74}.

1.5.2 Efectos del NO dependiente de dosis

El NO presenta un doble papel en el control de la diferenciación de CME y morfogénesis de tejidos, siendo los efectos del NO en la diferenciación y mantenimiento de la pluripotencia dependientes de la dosis (Figura 4). Se ha demostrado que el potencial del NO influye en la proliferación y cascada de diferenciación en determinados tipos celulares, y generalmente se considera como un inductor de apoptosis en algunos tipos celulares ^{75,76}, pero protege a otros tipos de la muerte celular programada ⁷⁷. Se ha demostrado que el NO regula la proliferación y diferenciación en células de la piel humanas, un descubrimiento que ayudará a explicar la patofisiología de enfermedades de la piel

⁷⁸. Nuestro grupo ha reportado que la exposición de CME a bajas concentraciones del DETA-NO (diethylenetriamine NO adduct), un donador químico de NO, previene la pérdida de expresión de genes de autorenovación y bloquea la diferenciación en CME de ratón y humanas. Del mismo modo, la sobreexpresión de NOS3 en células cultivadas en ausencia de LIF mantiene la expresión de marcadores de pluripotencia ⁷⁹. Por otro lado, se ha comprobado que la exposición de CME de ratón a altas concentraciones de DETA-NO promueve la diferenciación a través de la represión de Nanog y Oct4, los dos genes principales involucrados en el control del estado pluripotente, y del incremento de la expresión de genes de diferenciación temprana ⁸⁰.

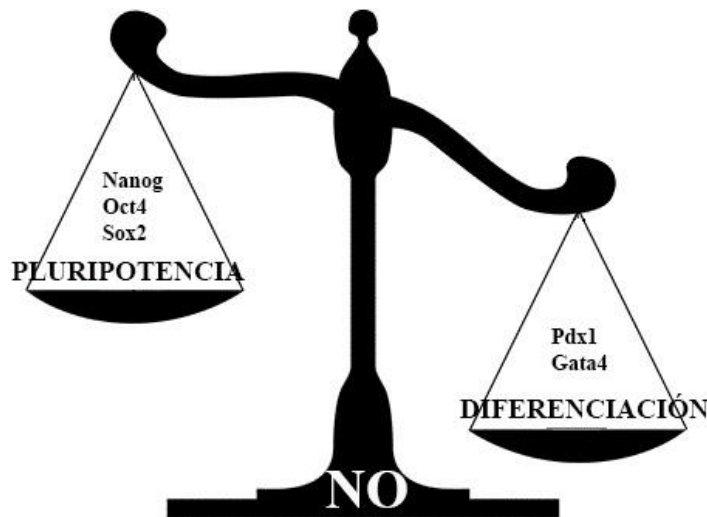


Figura 4. Doble papel del NO en CME. El NO presenta un doble papel dependiente de la dosis en el control de la diferenciación y mantenimiento de la pluripotencia. La exposición de CME a bajas concentraciones del donador de NO mantiene la pluripotencia, induciendo la expresión de Oct4, Nanog y Sox2; mientras que altas concentraciones de NO promueven la diferenciación a través de la represión de Nanog y Oct4 e induciendo la expresión de marcadores de diferenciación temprana como Pdx1 y Gata4.

1.5.3 Diseño de protocolos de diferenciación basados en el NO

Kanno *et al.* describieron en 2004 el primer protocolo de diferenciación eficiente usando CMER, demostrando que el NO promueve la diferenciación de CMEs de ratón hacia cardiomiocitos⁸¹. Otros grupos han mostrado que el NO está involucrado en la diferenciación vascular de tejido, indicando que el NO juega un papel en el desarrollo endotelial⁸². Un importante estudio con células MAPCs relata que el NO juega un papel principal en el mantenimiento de la pluripotencia y promueve su diferenciación endotelial⁶⁴. Diversos estudios han reportado que el NO modula el crecimiento y diferenciación de células humanas eritroides y mieloides de células de médula ósea⁸³, promueve la diferenciación hacia hueso y condrocito⁸⁴, estimula la diferenciación hacia adipocito en rata⁸⁵ y media la diferenciación hacia osteoblasto⁸⁶. Además se ha descrito que el NO induce cambios en la expresión de genes de factores de transcripción mediante la estimulación de vías de señalización⁸⁷⁻⁸⁹. Más concretamente, donadores de NO son empleados en protocolos de diferenciación con la consecuente expresión de Pdx1, mostrando al NO como un regulador del estado “stemness” y de la generación de endodermo definitivo^{79,80,90,91}.

Nuestro laboratorio ha desarrollado un protocolo de diferenciación de CMEs de ratón con el fin de establecer un protocolo para obtener células productoras de insulina a partir de células madre pluripotentes. Este protocolo consiste en la exposición de estas células a altas concentraciones de un donador

de NO (500µM) durante 19 horas después de tres días en cultivo. Se ha comprobado que este tratamiento suprime la expresión de genes de pluripotencia como Oct4 y Nanog, e induce eventos de diferenciación temprana y expresión de genes de diferenciación temprana tales como Zic1, Pdx1, Gata4, FoxA2 y Nkx2.5 entre otros ⁸⁰.

1.6 Marcador de diferenciación temprana Zic1

Zic1 (“Zinc finger protein of the cerebellum 1”) es un factor de transcripción dedo de zinc con 447 aminoácidos y 5 dominios C₂H₂. La mayor parte de la información registrada acerca de mismo lo relaciona con el sistema nervioso y ectodermo. Zic1 juega un papel temprano en el desarrollo de diferentes regiones del futuro sistema nervioso y está involucrado en la inhibición de la diferenciación neuronal prematura. Actúa como un activador transcripcional involucrado en neurogénesis y posee un importante papel en estadios tempranos de organogénesis del sistema nervioso central, así como en el desarrollo de la espina dorsal y maduración del cerebelo ^{92,93}. Existen múltiples enfermedades del sistema nervioso causadas por mutaciones o disfunciones de genes específicos, siendo Zic1 uno de los genes más relevantes, de modo que mutaciones en el mismo causa graves desórdenes del sistema nervioso, como holoprosencefalia, defectos en el tubo neural, disfunción cerebelar, malformaciones congénitas, desórdenes neurológicos y enfermedades autoinmunes ^{92,94}.

Se ha descrito que las familias de proteínas Zic y Gli son factores de transcripción que comparten dominios dedo de zinc similares, y existe evidencia de que las proteínas Zic y Gli interaccionan física y funcionalmente a través de sus dominios ⁹⁵. Además, otros estudios han mostrado que las proteínas Gli son intermediarios de la vía de señalización “Sonic hedgehog” (Shh), y que Zic1 es esencial para la regulación de Shh en el desarrollo neural ⁹⁶. Otro estudio ha mostrado crecientes evidencias de que Zic1 está involucrado en la progresión de tumores. Demostraron que la sobreexpresión de Zic1 suprime las vías de señalización Shh, PI3K y MAPK, las cuales son críticas para la regulación del ciclo celular y migración celular en cáncer gástrico, actuando así como supresor de tumores mediante la inhibición de la proliferación celular, la migración celular y la invasión en cáncer gástrico ⁹⁶. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de cómo Zic1 regula esta vía de señalización y sus genes Diana en tejidos de endodermo.

1.7 Medios químicamente definidos y expansión celular

En la actualidad se están llevando a cabo un gran número de ensayos clínicos con células madre mesenquimales humanas mediante la infusión o inyección de las mismas en el torrente sanguíneo en procesos clínicos alogénicos, con el fin de que no puedan ser detectadas por el sistema inmune del huésped ⁹⁷. Sin embargo, estos ensayos clínicos presentan el inconveniente de que requieren altas dosis celulares, entre uno y cinco millones de CMM por Kg de peso

corporal ⁹⁸. Para conseguir esta alta demanda en la expansión celular se necesitan métodos eficientes, siendo uno de los puntos más importantes para desarrollar terapias exitosas el mantenimiento de la calidad celular ⁹⁹.

La mayor parte de los medios de cultivo celular estándar contienen componentes animales como fuente de factores de crecimiento y nutrientes, principalmente suero fetal bovino (SFB). El incrementado uso de ensayos clínicos basados en terapias celulares para tratar enfermedades supone la demanda de un alto número de dosis celulares, con el consecuente aumento del uso de SFB y otros componentes animales para la producción de CMM ¹⁰⁰. Uno de los principales problemas para producir la gran cantidad de litros de medio necesarios es el alto coste de estos componentes. Además, la demanda anual de SFB es tan alta que para satisfacerla se necesitan más de un millón de fetos de vacas embarazadas, lo cual es alarmante. Por otro lado, el suero en general es una mezcla indefinida de casi 1000 moléculas biológicas, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, vitaminas, y otros muchos componentes desconocidos ²⁰. Éste puede ser considerado uno de los mayores inconvenientes del uso de estos medios, ya que el SFB y otros componentes de origen animal presentes en el medio, como insulina porcina, transferrina bovina o albúmina de suero bovino, incrementan el posible riesgo de transmisión de patógenos a pacientes, ya que entre el 20 y el 50% de los SFB comerciales son positivos para virus, y el antígeno xenogénico internalizado durante el cultivo con suero no puede ser eliminado ^{20,101,102}. En ese sentido, existen múltiples cuestiones éticas, científicas, económicas y de protección animal que solventar en los

sistemas de cultivo basados en el uso de SFB y otros componentes animales.

Existe una necesidad de generar sistemas de cultivo de células madre mesenquimales humanas efectivos y económicos, dado el aumento de las preocupaciones por la seguridad, así como cuestiones relacionadas con consistencia y reproducibilidad, lo cual son más que suficientes motivos para optimizar sistemas robustos de producción de células madre que empleen medios libre de componentes animales, surgiendo así la necesidad de desarrollar medios químicamente definidos.

Podemos describir un medio químicamente definido (MQD) como un medio útil para el cultivo de células humanas o animales in vitro en el cual se conocen con exactitud todos los componentes del medio, y el cual debe ser completamente libre de componentes derivados de animales, incluyendo SFB, albúmina de suero bovino, o albúmina de suero humano. Para sustituir la acción de esta fuente de nutrientes, los medios químicamente definidos son suplementados con determinados factores de crecimiento, pero debido al alto número de componentes que proporciona el suero, es difícil de definir un MQD. Los principales componentes que constituyen un MQD son un medio basal suplementado con albúmina recombinante, lípidos químicamente definidos, insulina recombinante, transferrina recombinante, selenio, y 2-mercaptoetanol ^{103,104}. Con lo cual, este medio libre de componentes animales surge como una alternativa para el cultivo de CMM humanas destinadas a ensayos clínicos,

manteniendo siempre los criterios principales: seguridad, eficacia, consistencia y reproducibilidad.

1.7.1 Ventajas de medios libre de suero

Una alternativa a los medios que contiene suero son los medios libres de suero (SFM), los cuales son considerados un tipo de medio químicamente definido, caracterizado por la ausencia de suero animal, pero que puede contener otros productos derivados de animales como albúmina, factores de crecimiento, hormonas, proteínas de transporte y factores de fijación ^{103,104}. Los medios libre de suero ofrecen multitud de ventajas frente a los medios estándares que contienen suero, entre las que destacan un mayor conocimiento de la composición del medio, reducción de los costes y reducción del riesgo de contaminación por agentes infecciosos presentes en el suero.

A continuación se muestra la Tabla 2, que recoge las ventajas que presenta un medio libre de suero frente a un medio con suero.

Tabla 2. Ventajas de un medio libre de suero

1. Componentes del medio definidos.
2. Evita el riesgo de transmisión de agentes infecciosos desconocidos por internalización de la proteína del suero en las células madre.
3. Evita la variación entre lotes de suero bovino o albúmina, lo que puede provocar inconsistencia en las propiedades estimulantes de crecimiento.
4. Favorece la purificación del producto dado el bajo contenido proteico.
5. Elimina el riesgo de contaminación por virus, bacteria, micoplasma, y priones derivados de productos animales, los cuales pueden ser transmitidos al producto final empleado por humanos, por ejemplo, encefalopatía bovina espongiiforme o enfermedad de las vacas locas.
6. Elimina factores que pueden interferir con hormonas o factores de crecimiento cuando se estudia su interacción con las células.
7. Evita las preocupaciones referentes a la disponibilidad limitada de suero fetal bovino, con periodos de escasez mundial.
8. Reduce los costes de producción, ya que el suero fetal bovino puede representar hasta el 85% del coste total del medio cuando se calcula para cultivos a gran escala.
9. Cada vez hay más preocupaciones sobre el sufrimiento animal infligido durante la recogida de suero, con lo que añaden un imperativo ético para alejarse de la utilización de suero siempre que sea posible.
10. El suero permite que células no-CMM se adhieran, generando una población heterogénea y que proliferan después del estado de aislamiento del cultivo primordial, lo cual no ocurre con SFM.
11. Evita las reacciones inmunes específicas de SFB.
12. Asegura la viabilidad, seguridad y eficacia de las CMMs trasplantadas, evitando las respuestas inmunes xenogénicas provocadas por la adherencia de proteínas bovinas a las células crecidas con medio que contiene SFB.
13. No requiere el riguroso proceso de selección y validación de los lotes de SFB, ya que no todos los lotes son útiles para el aislamiento y expansión de CMMs.
14. Las células no requieren de un paso de lavado extra tras la tripsinización para eliminar o reducir el contenido de SFB en las células.

1.7.2 Medios libre de suero comercialmente disponibles

La optimización de un medio útil para la producción de CMMs humanas que mantengan sus características de CMM sin mayor desviación en el proceso de producción, es crítica. En la actualidad se conocen algunos nuevos medios libres de suero disponibles, los cuales presentan una alta eficiencia y productividad, promueven la proliferación celular, mantienen una alta capacidad de las células de diferenciación hacia múltiples linajes celulares, y preservan un mejor estado pluripotente. Algunos de estos medios libres de suero comercialmente disponibles se detallan en la Tabla 3.

<i>Tabla3. Medios libres de suero comercialmentedisponibles (tabla modificada de la mostrada por Gottipamula et al.¹⁰⁰)</i>	
Nombre del producto	Compañía
1. BD Mosaic serum-free medium	BD Biosciences
2. CellGlo	CellGenix
3. MSC growth medium DXF	PromoCell
4. MesenCult-XF	Stem Cell Technologies
5. MesenGro	StemRD
6. MSc Qualified Plus	Compass Biomedical
7. MSC-Glo	Vitro Biopharma
8. MSCGS-ACF	ScienCell Research
9. mTeSR	Stem Cell Technologies
10. PRIME-XV MSC Expansion SFM	Irvine Scientific
11. RS-Novo and GEM-Novo	Kerry-Bioscience
12. TheraPEAK	Lonza
13. StemPro MSC SFM	Life Technologies
14. StemXvivo	R&D Systems
15. STK2	Two Cells Co. Ltd
16. TheraPEAK	Lonza
17. Ultrasor G	Pall Biosepra

“StemPro” de *Invitrogen* es probablemente el primer medio libre de suero comercialmente disponible, el cual ha sido reportado en el aislamiento y expansión de CMMs en diversos estudios ¹⁰⁵. Este medio ha sido descrito para diferenciación hacia linaje osteogénico y ha sido empleado eficientemente en ingeniería de tejido de hueso con CMMs de médula ósea ¹⁰⁶. En 2010 se realizaron pases secuenciales de CMMs usando el SFM StemPro, suplementado con bFGF, TGF- β and PDGF-BB ¹⁰⁷. Sin embargo, se comprobó más tarde que dos líneas de células madre dentales crecían mejor en el SFM comercial “Therapeak” de *Lonza* que en StemPro ¹⁰⁸. Posteriormente, otro medio libre de componentes animales fue optimizado, conocido como “MesenCult”, siendo éste un medio superior con un alto doblaje de población por pase ¹⁰⁹. Por otra parte, “mTeSR” es un medio de expansión de células madre embrionarias el cual ha sido descrito para la expansión de CMMs humanas derivadas de médula ósea. Se comprobó que las CMMs cultivadas en este SFM presentaban potencial de diferenciación tri-linaje y mostraban perfiles de marcadores similares a las células cultivadas en el medio control con suero. La diferenciación osteogénica y condrogénica fue similar con ambos medios; mientras que la capacidad de diferenciación adipogénica se vio reducida en las células cultivadas con mTeSR. A pesar de ello, sigue siendo una alternativa para la expansión de CMMs humanas para aplicaciones clínicas, como es el caso de generación de cartílago y hueso ¹¹⁰.

Todos estos medios libres de suero comercialmente disponibles han estado sujetos a un proceso de “*screening*” y

producción y aprobación de un estratégico proceso de control, para evaluar el mantenimiento de las características de CMM, la multipotencia y minimizar la contaminación y riesgo de transmisión de agentes adventicios, y la variación de lotes en la producción.

1.8 Cultivo a gran escala.

Recientemente, las células madre mesenquimales han adquirido un gran progreso en múltiples ensayos clínicos, pero el requerimiento de altas dosis celulares, entre $5 \cdot 10^4$ y $6 \cdot 10^9$ de células, es en la mayoría de los casos imposible de obtener con los métodos de cultivo 2D tradicionales ¹¹¹. Debido a esta demanda para futuras terapias celulares, surge la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo óptimos capaces de lograr cantidades significativas de células madres, de forma segura, robusta y económica, de acuerdo con los requerimientos de calidad para productos médicos. De esta forma, el uso de biorreactores usando “microcarriers” como matriz se presenta como una prometedora alternativa.

Cuando se desarrolla un proceso de cultivo a gran escala en biorreactor hay varios pasos críticos que deben ser tenidos en cuenta, tales como el aislamiento y purificación de la población de células madre, la estandarización de los parámetros de cultivo celular y las características necesarias para las aplicaciones clínicas a las que está destinado el proceso. Por tanto, los sistemas de biorreactores para terapias que requieren altas dosis celulares deberían ser diseñados para ofrecer las condiciones óptimas para la proliferación de las células

madre para lograr el número de células clínicamente relevante ¹¹². Con respecto a aplicaciones de ingeniería de tejido, los sistemas de cultivo en biorreactores deberían ser capaces de inducir la diferenciación de las células madre hacia linajes específicos, normalmente imitando las condiciones de formación de tejido in vivo ¹¹³.

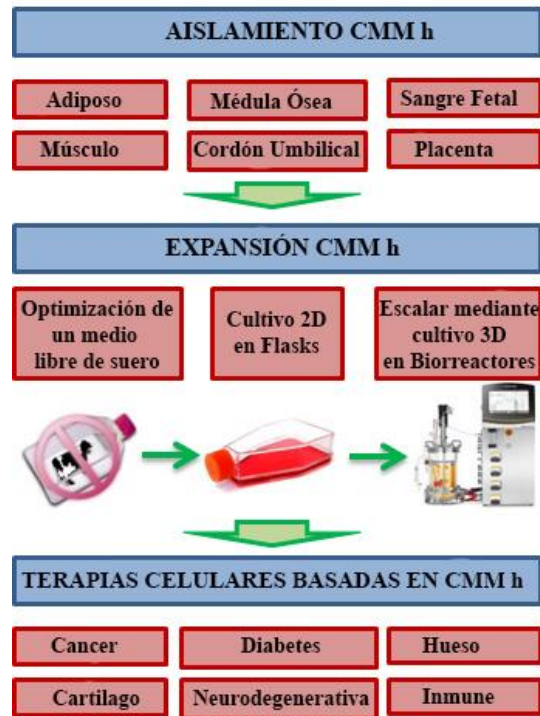


Figura 5. Pasos para la obtención de células madre mesenquimales para su aplicación terapéutica. 1) Aislamiento de las CMMs a partir de múltiples tejidos, como tejido adiposo, médula ósea, sangre fetal, músculo, cordón umbilical o placenta. 2) Expansión de las CMMs. Se subdivide en tres etapas: optimizar un medio libre de suero, cultivos tradicionales en 2D, y escalado a sistemas de cultivo 3D en biorreactores, para obtener altas dosis de CMMs. 3) Terapias celulares empleando las células obtenidas en el paso anterior para el tratamiento de diversas enfermedades: cáncer, diabetes, enfermedades de hueso, cartilago, corazón, inmunes y neurodegenerativas.

Interpretando la figura 5 podemos resumir el proceso de obtención de células madre mesenquimales para su aplicación

terapéutica en tres pasos principales. El primer paso consiste en el aislamiento de las mismas a partir de múltiples tejidos, como tejido adiposo, médula ósea, sangre fetal, músculo, cordón umbilical o placenta. En segundo lugar la expansión de las CMMs. Para ellos se optimiza un medio libre de suero optimizado, lo cual representa un paso necesario en ensayos clínicos, ya que evita riesgo de transmisión de patógenos. Finalmente este medio es optimizado en cultivos tradicionales en 2D, y escalado a sistemas de cultivo 3D en biorreactores, para obtener las altas dosis de CMMs requeridas para el tratamiento de importantes enfermedades humanas como el cáncer, diabetes, enfermedades de hueso, cartílago, corazón, inmunes y neurodegenerativas.

1.8.1 Ventajas del cultivo en biorreactores frente al cultivo en 2D

El cultivo, expansión y diferenciación de células madre ha sido optimizado en cultivos estándares en frascos de cultivo, los cuales presentan múltiples limitaciones en comparación con el uso de biorreactores, como la limitación de la productividad de las células adherentes por el área de cultivo, además de la dificultad de controlar los parámetros de cultivo como gradiente de nutrientes, temperatura, pH y O₂ disuelto; y finalmente la inversión de muchas horas de trabajo y la necesidad de grandes salas GMP para el extenso manejo en el proceso de cultivo ¹¹⁴.

Los sistemas de biorreactores basados en “microcarriers” presentan múltiples ventajas (Figura 6). En primer lugar proporcionan

una gran área de superficie por unidad de volumen del biorreactor, en comparación con el cultivo en frascos de cultivo, lo que supone una mayor producción, tanto que un biorreactor de 5 litros equivale a 65 frascos de cultivo confluentes de 175 cm². Gracias a las paletas, permite una mejor homogeneización, favoreciendo el crecimiento celular y la geometría. Además se obtiene un mayor “fold-increase”, una mejor tasa de crecimiento específico, un menor tiempo de doblaje, y se observa una reducción de los niveles de lactato y amonio, lo que favorece la productividad. Por otro lado, ofrecen la posibilidad de tener un control de los parámetros de cultivo, pH, temperatura y O₂ disuelto, así como tomar medidas de los mismos. Esta agitación además favorece que no se generen gradientes de pH, temperatura y O₂ disuelto. Además se ha comprobado que la morfología celular y potencial de diferenciación no son modificados tras el cultivo. Finalmente una gran ventaja es la facilidad de escalar, ya que la manipulación del proceso de cultivo no es tan laboriosa y no se requieren grandes áreas GMP ¹¹⁵.



Productividad	Limitada por el área de cultivo	No limitada
Control de parámetros (T°, pH y O₂ disuelto)	Imposible controlar	Control
Proceso de Cultivo	Extenso y Laborioso	Fácil proceso
Gradientes de nutrientes, pH, T° y O₂ disuelto	Formación de gradientes	No formación
Áreas de GMP	Grandes áreas de GMP	Sólo Biorreactor

Figura 6. Ventajas de los sistemas basados en “microcarriers” frente al cultivo tradicional 2D.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Actualmente el NO presenta un gran impacto en el diseño de protocolos de diferenciación basados en la adición del mismo a CME. Existen diversos estudios que reportan evidencias claras del papel del NO como regulador de la diferenciación, de forma que la adición del mismo a altas concentraciones al medio de cultivo induce la expresión de genes de diferenciación temprana como *Zic1*. Al mismo tiempo, hay estudios que describen la interacción de *Zic1* con las proteínas Gli y su papel en la regulación de la vía Shh. Proponemos como primera hipótesis de esta tesis que **“El gen *Zic1* está siendo regulado por un tratamiento basado en la adición de altas concentraciones de óxido nítrico en CMEs de ratón optimizado para la diferenciación de marcadores de endodermo, tratamiento que a su vez podría estar regulando la vía de señalización Shh a través de *Zic1*”**

Por otro lado, múltiples ensayos clínicos utilizando células madre mesenquimales de forma autóloga o alogénica están mostrando una gran eficacia, con el inconveniente de que supone un requerimiento de altas dosis celulares, entre $5 \cdot 10^4$ y $6 \cdot 10^9$ de células. Una cuestión muy importante a tener en cuenta en los cultivos a gran escala con propósitos terapéuticos es la gran cantidad de medio necesario para el cultivo, lo que conlleva el elevado uso de sueros derivados de animales y otros componentes que incrementan considerablemente los costes de producción, así como el posible riesgo de transmisión de patógenos a los humanos. Además, se ha demostrado que la adición de óxido nítrico a bajas concentraciones al

medio de cultivo mantiene las principales características de potencia de las células madre y retrasa la entrada a la diferenciación. Con lo cual en esta tesis planteamos como segunda hipótesis que **“la adición de NO a bajas concentraciones al medio de cultivo es capaz de suplementar parcialmente la función de los factores de crecimiento LIF y bFGF, necesarios para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células, permitiendo así optimizar un medio de cultivo químicamente definido con la concentración de dichos factores reducida y libre de suero”**. De esta forma se solventan los inconvenientes planteados anteriormente referentes al coste de producción y riesgo de transmisión de patógenos, acercando un poco más la investigación a gran escala con células madre a convertirse en una realidad.

Para demostrar ambas hipótesis se plantean los objetivos detallados en los siguientes puntos.

2.2 Objetivo General

Regulación de la expresión del gen *Zic1* por altas concentraciones de Óxido Nítrico

El principal objetivo de esta tesis es determinar el mecanismo por el cual el óxido nítrico modula la regulación del gen de ectodermo *Zic1*, así como la vía de señalización Sonic Hedgehog en células madre embrionarias de ratón, y además demostrar la presencia de este gen en células pancreáticas adultas.

Diseño y Optimización de un Medio de cultivo Químicamente Definido suplementado con bajas concentraciones de NO

La finalidad del proyecto en el que está enmarcada esta tesis es generar dosis celulares adecuadas para propósitos terapéuticos, y que puedan ayudar a proponer ensayos clínicos que puedan ser usados en el tratamiento de patologías relacionadas con la diabetes. Surge así como objetivo general: La optimización de un medio de cultivo químicamente definido libre de suero y otros componentes animales y suplementado con NO para la expansión de células madre humanas, primero en sistemas de cultivo en 2D, y luego a gran escala mediante el cultivo con “microcarriers” en biorreactores.

2.3 Objetivos Específicos

Regulación de la expresión del gen Zic1 por altas concentraciones de Óxido Nítrico

- Estudio de la regulación génica de Zic1 por NO en CME de ratón, mediante el análisis de su expresión por PCR cuantitativa, Western-Blot e inmunofluorescencia; así como su regulación por el factor de transcripción Egr1 mediante un ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina.
- Estudio de la expresión de Zic1 en islotes de células pancreáticas mediante ensayos de PCR cuantitativa, Western-Blot e inmunofluorescencia.
- Comprobar si el tratamiento con NO modifica la vía de señalización de Shh. Para ello estudiaremos la expresión de los genes diana de dicha vía (Gli1, Gli2, Gli3, Patched y Nanog)

después del tratamiento mediante PCR cuantitativa y Western-Blot.

- Sobreexpresar *Zic1* y determinar mediante PCR cuantitativa y Western-Blot los cambios en la expresión de los genes diana de la vía Shh, así como de genes de diferenciación hacia endodermo (*Pdx1*).

Diseño y Optimización de un Medio de cultivo Químicamente Definido suplementado con bajas concentraciones de NO

- Estudiar el efecto de bajas concentraciones de NO y reducción de LIF en un medio definido sobre Células Madre Embrionarias de ratón (CMEr).
- Estudiar el efecto de bajas concentraciones de NO y reducción de bFGF en un medio definido sobre Células Madre Embrionarias humanas (CMEh)
- Estudiar el efecto de bajas concentraciones de NO, reducción de bFGF y ausencia de suero en un medio definido sobre Células Madre Embrionarias humanas (CMEh)
- Estudiar el efecto de bajas concentraciones de NO y reducción de la concentración de suero fetal bovino en un medio definido sobre Células Madre Mesenquimales humanas (CMMh) de tejido adiposo
- Estudiar el efecto de bajas concentraciones de NO, reducción de bFGF y ausencia de suero fetal bovino en un medio definido sobre Células Madre Mesenquimales humanas (CMMh) de tejido adiposo y de médula ósea

- Estudiar la adherencia de las células madre mesenquimales de tejido adiposo a los microcarriers mediante el uso de biorreactores y “spinnerflasks” en el cultivo con los medio definidos optimizados en los objetivos anteriores.

Para lograr dichos objetivos desarrollaremos las siguientes actividades:

- Analizar la proliferación celular mediante incorporación de BrdU.
- Analizar la expresión de los marcadores de pluripotencia Nanog y Oct4 mediante PCR cuantitativa.
- Analizar la morfología celular mediante toma de imágenes en un microscopio.
- Analizar la proliferación celular mediante conteo del número total de células con cámara de Neubauer.
- Analizar las características fenotípicas mediante citometría de flujo.
- Analizar la proliferación celular mediante el estudio de la expresión de Ki-67 en un ensayo de inmunofluorescencia.
- Analizar el potencial de multilinaje de las células mediante la inducción de la diferenciación de las mismas hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos.

3. Materiales y Métodos

3.1 Líneas de Células utilizadas

Las líneas celulares empleadas en cultivo fueron la línea de células madre embrionaria de ratón comerciales **R1/E** (ATCC: SCRC1036, Universidad Boulevard, Manassas, USA), una línea de células madre embrionaria de origen humano **HS181**, generadas por *O. Hovattay* cedida por el Instituto Karolinska; células pancreáticas adultas **INS-1E** y **MIN6**, células neuronales humanas **HS-SY5Y**, y dos líneas de células madre mesenquimales, de Tejido Adiposo **PCS 500-011** y de Médula Ósea **PCS 500-012**.

3.2 Cultivos celulares

Para el cultivo de las CMEs de ratón **R1E** se empleó un medio de cultivo compuesto por: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco 32430-100, Carlsbad, CA, USA), suplementado con un 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado (Hyclone SH30070-03, Logan, UT, USA), 5000 U/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122), 2mM L-Glutamina (Gibco 25030-032), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035), 0,1mM β -Mercaptoetanol (Gibco 131350-010). El estado indiferenciado de las CMEs fue mantenido adicionando 1000 U/ml de rLIF (factor inhibidor de leucemia recombinante) (Gibco) al medio de cultivo. Para el pase celular se empleó Tripsina 1X, almacenada a -20°C y precalentada a 37°C, con centrifugación a 1000rpm durante 5 minutos.

Las células pancreáticas adultas **INS-1E** and **MIN6** fueron mantenidas a 37° C con 5% CO₂ en RPMI-1640 (LONZA, San Diego, USA), suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (Gibco 10828-028), 10mM HEPES (Gibco, Paisley, Scotland, UK), 1mM piruvato

sódico (Gibco, Paisley, Scotland, UK), 100 U/ml penicilina: 100 µg/ml estreptomicina (Gibco 15140-122), 2mM L-glutamina (Gibco 25030-032) y 50 µM β-mercaptoetanol (Gibco 131350-010).

Las CMEs humanas línea **HS181** fueron cultivadas en adherencia en placas de cultivo de tejidos cubiertas con Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y se empleó un medio de cultivo compuesto por: KNOCKOUT DMEM (Gibco 10829-018), suplementado con un 20% de Sustituto de Suero inactivado (Gibco 10828-028), 5000 U/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122), 2mM L-Glutamina (Gibco 25030-032), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035), 0,1mM β-Mercaptoetanol (Gibco 131350-010). El estado no diferenciado se mantuvo agregando en el medio de cultivo condicionado por fibroblastos 8 ng/ml bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico). Para el pase celular se empleó Acutasa, almacenada a -20°C y precalentada a 37°C, con centrifugación a 800rpm durante 5 minutos. Para la preparación del medio condicionado, se utilizaron fibroblastos de prepucio humanos cultivados en frascos de cultivo de 75 tapizados con gelatina y mantenidos a 37°C en 5% de CO₂, e inactivados con mitomicina. Para el cultivo de los fibroblastos se empleó un medio de cultivo compuesto por: KNOCKOUT DMEM (Gibco 10829-018), suplementado con un 20% de Sustituto de Suero inactivado (Gibco 10828-028), 5000 U/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122), 2mM L-Glutamina (Gibco 25030-032), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035), 0,1mM β-Mercaptoetanol (Gibco 131350-010). Para el pase celular se empleó Tripsina 1X.

En cuanto a las células madre mesenquimales humanas de Tejido Adiposo (**PCS500011**) y de Médula Ósea (**PCS500012**), fueron cultivadas en placas adherentes mantenidas a 37°C y 5% CO₂. El medio control está compuesto por DMEM bajo en glucosa + “Glutamax”, piruvato Cat. 21885 (GIBCO), 10% v/v Suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) y Penicilina/Estreptomicina (100U/mL, 100ug/mL). El cultivo a estudiar se realizó en el medio MQD-CABIMER, compuesto por Dulbecco’s Modified Eagle Medium F12, libre de Suero Fetal Bovino (SFB), 5000 U/ml Penicilina/Estreptomicina, 2mM L-Glutamina, 1% aminoácidos no esenciales, y otros componentes optimizados: ácido ascórbico (0.064mg/ml), selenito de sodio (0.014µg/ml), insulina (0.019mg/ml), transferrina (0.0107mg/ml), bicarbonato sódico (0.543mg/ml) y TGF-β (0.002µg/ml). El bFGF (Basic fibroblast growth factor) es un componente crítico en el cultivo de células madre humanas, siendo necesario para el mantenimiento del estado indiferenciado de las mismas. Para el pase celular se empleó TrypLE 2x, almacenado a 4°C y precalentada a 37°C, con centrifugación a 1000rpm durante 5 minutos en tubos de polietileno para evitar que las células se queden adheridas en el plástico. Se empleó vitronectina (rhVTN-N A14700) como matriz adherente en las placas para las células cultivadas con el medio químicamente definido.

3.3 Cultivo Celular en “SpinnerFlasks” y Biorreactores

Para el cultivo de las células CMMh de tejido adiposo PCS500011 en 3D se emplearon “spinnerflasks” y biorreactores, siguiendo el mismo protocolo de cultivo en “microcarriers” en ambos casos. Para ello se

pesaron 500 mg de “microcarriers” y fueron autoclavados en tubos de 15 ml con 10 ml de agua estéril. Antes del cultivo, los “microcarriers” fueron equilibrados, para lo que fueron añadidos al vaso del “spinnerflask”/biorreactor con 50 ml de medio de cultivo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las células cultivadas en frascos de cultivo de 175cm² fueron lavadas con DPBS, levantadas con TrypLE 2x y sembradas en los “spinnerflasks”/biorreactores. Sembramos 6500 células/cm², teniendo en cuenta que 500 mg de transportadores corresponden a 250 cm², sembramos 1625000 células totales. En el caso de los “spinnerflasks”, éstos fueron colocados sobre agitadores magnéticos e introducidos en un incubador a 37°C y 5%CO₂. En el caso de los biorreactores, éstos fueron programados para que mantuviesen la temperatura y pH óptimos. Los “spinnerflasks” mantuvieron una agitación constante de unas 80 rpm, y los biorreactores de 150 rpm. El cambio de medio se realizó diariamente añadiendo al MQD-CABIMER 75% bfgf, 10µl de DETA-NO a 10mM, para establecer la condición 2µM DETA-NO; y al medio 5% SBF añadimos 25µl de DETA-NO a 10mM para establecer la condición 5µM DETA-NO. Para confirmar la adherencia celular, llevamos a cabo un ensayo de inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo detallado más abajo, donde las células fueron incubadas con anti-tubulina 1:500 en 1,5% BSA PBS-Tritón 0,2% toda la noche a 4°C. La detección del anticuerpo primario se obtuvo incubando con anti-mouse 1:300 alexa fluor 488 (Invitrogen, A11001) en 1,5% BSA PBS-Tritón 0,2% durante 1 hora a T.A en oscuridad. Finalmente se tiñó con DAPI 1:1000 en PBS durante 5 minutos y se visualizaron las imágenes fluorescentes al microscopio de fluorescencia.

3.4 Aislamiento ARN total y Transcripción Reversa

El ARN total de todas las líneas celulares fue extraído directamente en las placas usando el reactivo Easy Blue® (Intron Biotechnology Kyungki-Do, Korea), y purificado mediante fenol/cloroformo (Applychem), seguido por precipitación en iso-propanol y lavados con etanol al 75%. El ARN fue re-suspendido en agua libre de nucleasas y conservado a -20°C hasta su uso para síntesis de ARN complementario (ARNc) o ADN complementario (ADNc), para el estudio de expresión de genes de pluripotencia. La pureza del ARN total fue evaluado midiendo la absorbancia de cada muestra a 260 y 280 nm, determinando así concentración y pureza usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Willmington, DE). Para la transcripción inversa se mezclaron 1 µg del ARN total con 5 U/µL of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) y 12.5 µg/µL de “randomprimers” (Promega) en un volumen de 25 µl e incubado durante 1h a 37°C. Estos reactivos se encuentran almacenados a -20°C.

3.5 Caracterización Celular por PCR Cuantitativa en tiempo real y PCR Cualitativa

Para el análisis de PCR a tiempo real, los niveles de ARNm endógenos fueron medidos usando SYBR Green Master Mix (Roche) y el termociclador 7500 Real Time PCR System® (Applied Biosystem). Para cada 20 µL de reacción, la mezcla contenía: 10 µL de SYBR Green 2X master mix®, 0.2 µM de oligonucleotidos específicos, 1 µL de ADNc diluido y agua hasta un volumen final 20 µL de reacción. La reacción de PCR cuantitativa en tiempo real fue realizada en untermociclador 7500 Real Time PCR system®

(AppliedBiosystems) con los siguientes parámetros de amplificación: 95° durante 10 minutos, 95° durante 30 segundos, 60° durante 1 minuto, durante 40 ciclos. La adquisición de los datos fue a 60°C y fueron analizados con el programa de la propia casa comercial 7500® v 2.01. Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la expresión del control endógeno β -actina, y todos los datos fueron analizados usando el método $\Delta\Delta C_T$ ¹¹⁶.

En los estudios de PCR cualitativa, para cada 20 μ L de reacción, la mezcla contenía: 4 μ L de “Mytaq Red reaction buffer” 5X, 0.2 μ M de oligonucleótidos específicos, 1 μ L de ADNc diluido, 0,5 μ L de “MyTaq Red DNA Polymerase” y agua hasta un volumen final de 20 μ L de reacción. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador “MyCycler” de Biorad con los siguientes parámetros de amplificación: 95° durante 5 min, 95° durante 30 seg, 60° durante 15 seg, 72° durante 15s por 35 ciclos. Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la expresión del control endógeno β -actina.

Todos los cebadores fueron pedidos a Integrated DNA Technologies (IDT). Los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla (Anexo)

3.6 Extracción de proteínas e inmunodetección

Las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y lavadas con PBS frío. Los pellets celulares fueron resuspendidos e incubados en buffer RIPA (Sigma R0278), suplementado con inhibidor de proteasa (Sigma S8830) e inhibidor de fosfatasa (Sigma, P5726), durante 45 minutos en hielo, y sonicados en 4 pulsos de 10 segundos y 10% de amplitud

en un ultrasonicador (Branson Digital Sonifier, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA). Tras la centrifugación de 15 minutos las proteínas en el sobrenadante fueron cuantificadas mediante Bradford. Las proteínas fueron desnaturalizadas en buffer Laemly suplementado con β -mercaptoetanol (Sigma, 64-20-2) 2.5% durante 10 minutos a 96°C. Las proteínas totales fueron separadas a través de un gel de acrilamida y transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con anti-Zic1 1:2000 (abcam, ab24204), anti-Pdx1 1:1000 (Abcam, ab47267, Cambridge, UK), anti-Gli1 1:2500 (GeneTex, GTX124274), anti-Gli3 1:2000 (GeneTex, GTX104362) y anti-Gli2 1:250 (Santa Cruz, sc271786) diluidos en 5% de leche en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C. Como control de carga se incubó con anti- β -Actina 1:10000 (Sigma A5441) en 5% de leche en TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ello las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con TBS-Tween. Los anticuerpos secundario fueron anti-rabbit IgG (LI-COR, 926-32211) y anti-mouse IgG (LI-COR, 926-68070). Finalmente las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con TBS-Tween y reveladas mediante fluorescencia con ODDYSSEY CLx (LI-COR).

3.7 Inmunocitoquímica

Para analizar la expresión de Zic1 tras el tratamiento con NO se cultivaron 30×10^3 células por placa en placas con lamelas cubiertas con matrigel. Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 10 minutos, permeabilizadas con metanol frío (-20°C) durante 5 minutos y bloqueadas con 3% BSA PBS-Tritón 0,2% durante 1

hora. Tras ello, fueron lavadas con PBS 1x e incubadas toda la noche con 1:100 anti-Zic1 (abcam, ab24204), and 1:300 anti- α Tubulin (Sigma). Para los ensayos de inmunofluorescencia del páncreas y tejidos de cerebro, los cortes fueron fijados en 4% de paraformaldehído en PBS durante toda la noche a 4°C, deshidratados con etanol y xileno y embebidos en parafina. Las secciones fueron cortadas con un espesor de 5 μ m con un micrótopo Leica DM6000B. Las secciones fueron des-parafinadas mediante una serie de lavados con xileno y etanol, lavadas con PBS durante 5 minutos y autoclavadas con una solución buffer citrato 0,01M. Posteriormente se bloquearon con 3% de BSA y 0,2% Triton X-100 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas toda la noche a 4°C con 1:100 anti-Zic1 (abcam, ab24204) y 1:100 anti-Pdx1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, F109-D12, Iowa, USA). En ambos casos las células fueron lavadas tres veces por 5 minutos con PBS-Tween y la detección del anticuerpo primario se obtuvo incubando con los anticuerpos fluorescentes anti-rabbit Alexa fluor 594 (Invitrogen A21207, Carlsbad, USA) y anti-mouse Alexa fluor 488 (Invitrogen, A11001) a una concentración 1:300 en 3% BSA PBS-Tritón 0,2% durante una hora en oscuridad. Finalmente las células fueron lavadas tres veces por 5 minutos con TBS-Tween y teñidas con DAPI 300 μ M 1:1000 durante 5 minutos. Las imágenes fluorescentes se obtuvieron usando el microscopio Leica DM 5500 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany), y fueron procesadas mediante Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

3.8 Ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina.

Las células R1E fueron fijadas con formaldehído 1% durante 10 minutos a 37°C. 3×10^6 células fueron re-suspendidas durante 10 minutos en hielo en buffer de lisis compuesto por 10mM NaCl, 10mM TrisHCl (pH8), 3mM Cl_2Mg y 0.5 mM DTT suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma S8830). Las células fueron centrifugadas 5 minutos a 3000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el núcleo celular fue lavado por inversión con buffer de lavado compuesto por Tris HCl 10mM (pH8), NaCl 15 mM and KCl 60 mM. Se centrifugó durante 5 minutos a 3000rpm a 4°C, y se incubó el núcleo celular con buffer de lavado suplementado con 3mM Cl_2Ca , inhibidores de proteasas, DTT 0.5 mM y 5-10 μl de nucleasa micrococcal diluida 1:200 (M0247S, New England BioLabs) durante 20 minutos a 37°C en un agitador orbital a 100 rpm. Para detener la acción de las nucleasas se añadieron 20 μl de EDTA 0,5 mM. Se centrifugó durante 5 minutos a 3000rpm a 4°C. El núcleo celular fue roto con un buffer compuesto por NaCl 150mM, TrisClH 50mM (7.5), EDTA 5mM, NP-40 0.5%, Triton 1%, SDS 0.01% y sometido a tratamiento ultrasonidos en tres pulsos de 10 segundos al 10% de amplitud en un aparato de ultrasonidos. Se centrifuga 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante con los extractos de cromatina con un tamaño medio de 500pb fue inmunoprecipitado usando de 2 a 4 μg de anticuerpo por muestra. El anticuerpo empleado fue anti-Egr1 (Santa Cruz Biotechnology. 588). Como controles de chip se emplearon el Control IgG de conejo (Chip Grade, Abcam ab46540), y el Control isotipo IgG1 de ratón (Cell Signalling, G3A1). Para el complejo anticuerpo-bolas se emplearon 15 μL of “Dynabeads®”

(Invitrogen, Dynal AS, Oslo, Norway) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C bajo rotación en buffer de dilución (SDS 0.01%, Triton X-100 1.1%, EDTA 1.2 mM, tris HCl 16.7 mM pH8.1, NaCl 167 mM). Tras ello se añadió la cromatina y se incubó durante 1 hora en rotación a 4°C. Se realizaron lavados consecutivos del complejo con buffer bajo en sales (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, tris HCl 20 mM pH8.1, NaCl 150 mM), buffer alto en sales (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 Mm, tris HCl 20 mM pH8.1, NaCl 500 mM), buffer LiCl (LiCl 0.25M, NP40 1% (Igepal), deoxycholate 1%, EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM pH 8), dos veces con buffer TE (Tris HCl 10mM pH 8.1, EDTA 1 mM) y finalmente eluido con 500 µL de buffer de elución (SDS 1%, NaHCO₃ 0.1M). Se purificó el ADN con el protocolo fenol:cloroformo. Se realizó el análisis del CHIP mediante una PCR cuantitativa usando “Sybr Green”. La ocupación del promotor fue determinada mediante el método de “percent input” relativizado a la condición de pluripotencia (+LIF). Los cebadores de Zic1 empleados se muestran en la tabla Anexo1.

3.9 Ensayos de pérdida y ganancia de función de Egr1

Las células R1E fueron transfectadas con pCG-HA-Egr1, un plásmido de expresión de Egr1 cedido por el Dr. Shigeru Taketani, usando el reactivo de transfección Fugene HD (Promega). La sobreexpresión de Egr1 se confirmó mediante RT-PCR.

La expresión de Egr1 fue silenciada transfectando las células R1E con un shRNA (Sigma) empleando el reactivo de transfección Fugene HD (Promega). El silenciamiento fue confirmado mediante RT-PCR.

3.10 Construcción del plásmido de expresión Zic1 y transfección celular

Para construir un plásmido de expresión de Zic1, la secuencia que codifica el ORF (“Open Reading Frame”) fue clonada en el vector de expresión de mamíferos pCDNA3.1-HIS. El ORF de Zic1 fue amplificado a partir de cDNA de células cultivadas en presencia de LIF y NO usando la polimerasa MyTaqTM HS Red (BIOLINE). Inserto y vector fueron digeridos con las enzimas de restricción EcorI and XhoI (Promega) y ligados con la ADN ligasa T4 (Promega, M180). Para generar una transfección estable, las células R1E fueron transfectadas con pCDNA3.1-HIS-Zic1 o el vector vacío pCDNA3.1-HIS usando el reactivo de transfección Fugene HD (Promega), y fueron seleccionadas con G418 (250 µg/ml) hasta que las células silvestres murieron. La sobreexpresión de Zic1 fue confirmada mediante RT-PCR y Western-Blot de las colonias supervivientes.

3.11 Ensayos de Proliferación Celular

Para determinar la proliferación celular se realizaron tres ensayos diferentes: el recuento directo mediante ensayo de exclusión por azul de Trypan, la incorporación de BrdU, la expresión de ki67 por inmunocitoquímica.

3.11.1 Ensayos de Proliferación Celular por exclusión por azul de Trypan

Para los estudios por conteo del número total de células al finalizar el cultivo, las células fueron sembradas en placas de 10cm² y tras finalizar el tratamiento fueron individualizadas

usando TrypLE 2x durante 5 minutos. A continuación se neutraliza la enzima adicionando un volumen de medio de cultivo y las células fueron recuperadas por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se re-suspende en 1ml de DPBS si es para recoger, o de medio de cultivo si es para volver a sembrar y expandir. Se procedió al conteo mediante cámara de Neubauer usando azul de trypan y obteniendo el número de células/ μ l, y multiplicando por 1000 μ l (volumen re-suspendido) obtuvimos el número total de células, de los diversos cultivos y del control. Para representarlo y visualizar el aumento o disminución de la proliferación en el cultivo con los distintos medios con respecto al control realizamos gráficos de barras usando Microsoft Excel.

3.11.2 Ensayo de Proliferación Celular por Incorporación de BrdU

Los estudios de proliferación celular por incorporación de BrdU se realizaron usando el Kit “Cell Proliferation ELISA BrdU”. Para ello, las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con 100 μ l de medio de cultivo, poniendo cada condición de cada medio por triplicado. Dicho kit consiste en la incubación con BrdU 1:100 de las células en la palca de cultivo durante 16 horas a 37°C, siendo la incorporación de BrdU al ADN celular favorecida cuanto más prolongada sea la incubación. Tras ello se fija y se incuba con el anticuerpo anti-BrdU 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se

realizan tres lavados y se incuba con la reacción sustrato de 5 a 30 minutos a temperatura ambiente, hasta que el color sea suficiente para la detección fotométrica. Finalmente se determina la proliferación midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 450nm, y se representan los datos en un gráfico de barras usando Microsoft Excel.

3.11.3 Ensayo de Proliferación Celular por Inmunocitoquímica

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para confirmar la capacidad de proliferación de las células. Para ello las células mesenquimales fueron cultivadas en placas que contienen lamelas cubiertas con matrigel® en una densidad de 3000 células/cm². Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 10 minutos, permeabilizadas con metanol frío (-20°C) durante 5 minutos y bloqueadas con BSA 3% PBS-Tritón 0,2% durante 1 hora. Tras ello, fueron lavadas con PBS 1X e incubadas toda la noche con 1:100 anti-Ki67 (abcam ab15580) y 1:300 anti- α Tubulina (Sigma T-6199) en BSA 3% PBS-Tritón 0,2%. Las células fueron lavadas tres veces por 5 minutos con PBS-Tween y la detección del anticuerpo primario se obtuvo incubando con los anticuerpos fluorescentes anti-rabbit Alexa fluor 594 (Invitrogen A21207, Carlsbad, USA) y anti-mouse Alexa fluor 488 (Invitrogen, A11001) a una concentración 1:300 en BSA 3% PBS-Tritón 0,2% durante una hora en oscuridad. Finalmente las células fueron lavadas tres veces por 5 minutos con TBS-Tween y teñidas con DAPI 300 μ M 1:1000 durante 5 minutos. Las

imágenes fluorescentes se obtuvieron usando el microscopio Leica DM 5500 (Leica Microsystems, WetzlarGermany), y fueron procesadas mediante Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

3.12 Ensayos de Morfología

Para determinar la morfología celular con los diferentes cultivos, se realizaron ensayos de comparación visual de la morfología con respecto al control. Para ello se tomaron fotos de los diferentes cultivos en las sucesivas semanas empleando un microscopio invertido con una cámara acoplada Leica DFC490. Con ello también se obtuvo una idea de si la densidad celular aumentaba con respecto al control y con respecto a los pases anteriores.

3.13 Caracterización Celular por Citometría de flujo

La calidad celular es un factor importante a la hora de optimizar un medio de cultivo, para lo cual es necesario comprobar que las células mantengan sus características fenotípicas, lo cual fue determinado mediante ensayos de Citometría de Flujo en las células madre mesenquimales. Para ello las células fueron levantadas mediante TrypLE 2x durante 5 minutos y recuperadas por centrifugación a 1000 rpm 5 minutos. El pellet fue re-suspendido en 600 µl de DPBS y repartido en 6 tubos de citómetro con 100 µl. Las células fueron incubadas en oscuridad durante 30 minutos a 4°C con los anticuerpos anti-humanos monoclonales 1:30 anti-CD73-PE (BD, 550257), 1:50 anti-CD90-FITC (BD, 555595), 1:50 anti-CD105-PE (BD, 560839), 1:30 anti-CD45-FITC (BD, 345808), 1:30 anti-HLA-DR-FITC (BD,

555558), 1:30 anti-CD34-PE (BD, 555822). Tras la incubación se realizó un lavado con PBS 1X, centrifugó y re-suspendió en 400 µl de PBS 1X y los datos de caracterización fueron obtenidos en el Citómetro de Flujo FACScan.

3.14 Caracterización Celular: Potencial Multi-linaje.

El potencial multi-linaje de las células fue determinado mediante la inducción de las muestras tras la expansión con los kit “StemProAdipogenesis”, “StemProChondrogenesis” y “StemProOsteogenesis” (Life Technologies, UK). El medio de diferenciación fue preparado según las instrucciones del fabricante, descongelando durante toda la noche el suplemento y añadiéndolo al medio de diferenciación basal correspondiente a cada linaje.

La diferenciación hacia condrocitos implica la formación de una micromasa de CMMh, generada mediante la siembra de 10^7 células/ml en 50 µl de suspensión formando una gota en una placa de 6 pocillos. Se incubó durante 2 horas en el incubador a 37°C y 5% de CO₂, y tras ello se adicionó 1ml del medio de diferenciación condrogénica, y se devolvió al incubador.

La diferenciación hacia adipocitos y osteocitos se realizó mediante la siembra de las células en una placa de 6 pocillos a una concentración de 5000 células/cm², en el medio de crecimiento correspondiente y colocándolo en un incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante tres días. A los tres días el medio fue remplazado.

El medio de diferenciación para cada ensayo fue reemplazado cada 72 horas, con una duración final del proceso de 21 días. En este punto, se procedió a la tinción de las células. Aquellas que dieron lugar a

diferenciación condrogénica fueron teñidas con Alcian Blue, para lo que previamente fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas tres veces con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , e incubadas con la solución Alcian Blue 1% durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras ello las muestras fueron lavadas con PBS tres veces y una vez con 1ml de agua destilada. Tras el último lavado las muestras fueron observadas al microscopio. En el caso de la diferenciación osteogénica, las células fueron fijadas con buffer neutral formalina 10% frío durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y mantenidas en agua destilada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron con la solución fosfatasa alcalina Naftol AS-MX 4% en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizaron tres lavados con agua destilada y se incubaron las muestras con AgNO_3 2.5% durante 30 minutos a temperatura ambiente, y lavadas tres veces con agua destilada. Tras el último lavado las muestras fueron observadas al microscopio. Finalmente las células que generaron adipocitos fueron fijadas con PFA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y teñidas con Oil-Red 1% en isopropanol a temperatura ambiente. Fueron lavadas tres veces con agua destilada y observadas al microscopio.

3.15 Análisis de la adherencia celular usando el equipo iCELLigence.

Se cultivaron 6000 células/cm² de células madre mesenquimales humanas de Tejido Adiposo en las placas proporcionadas para el equipo. Se establecieron dos condiciones en el experimento, células

cultivadas sobre gelatina y células cultivadas sobre vitronectina. Se programó el equipo para tomar una medida cada hora, y se detuvo a las 55 horas. Se obtuvo una representación de la tasa de proliferación frente al número de horas.

3.16 Análisis estadístico

Los datos representados son las medias más la representación de la desviación estándar de como mínimo tres experimentos independientes. Las comparaciones entre los valores fueron analizados usando un test de T-student one-tailed. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

4.Resultados

Regulación de la expresión del gen *Zic1* por altas concentraciones de Óxido Nítrico

4.1 El NO incrementa la expresión de *Zic1* en CME de ratón

Hemos analizado la expresión génica y proteica de *Zic1* en CMEs de ratón cultivadas en presencia y ausencia de LIF durante 3 días y 500 μ M DETA-NO (19h). Los resultados obtenidos por ensayos de PCR, Western-Blot e inmunofluorescencia mostraron que la expresión de *Zic1* en presencia de NO incrementaba considerablemente (Figura 7, paneles A y B). Además en los ensayos de inmunofluorescencia revelaron una co-expresión de *Zic1* con el gen de endodermo *Pdx1* en estas células en presencia de NO (Figura 7, paneles C y D).

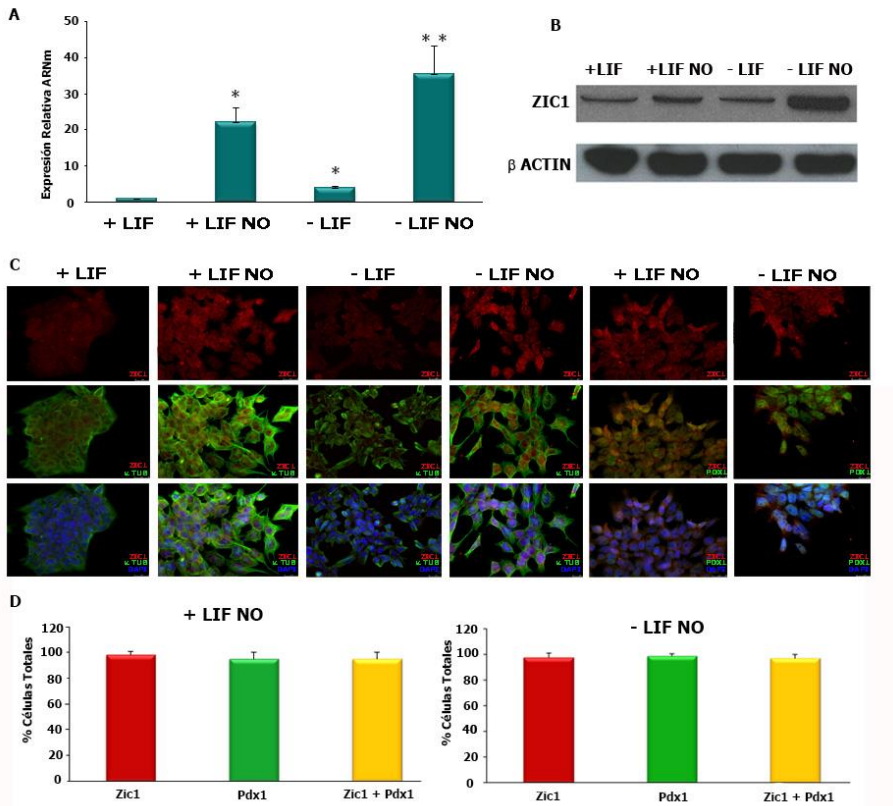


Figura 7. Análisis del efecto del NO en la expresión de Zic1 en CMEr. **A)** PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados a los CTs β -Actina, usada como control de carga y analizado usando el algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un test de “T-student”: * $P < 0,05$ es estadísticamente significativo frente a células cultivadas en presencia de LIF, ** $P < 0,05$ frente a células cultivadas en presencia y ausencia de LIF. **B)** Western-Blot. Empleamos β -Actin como control de carga. Los resultados mostrados son los más representativos de tres experimentos. **C)** Ensayo de Inmunofluorescencia. Las imágenes muestran el cultivo celular en las cuatro condiciones y seguidamente teñidas con DAPI (azul), Zic1 (rojo), α -TUBULINA (verde) y Pdx1 (verde). Barra de escala 25 μ M. Las imágenes mostradas son las más representativas de tres experimentos. **D)** Cuantificación de la co-expresión de Zic1 y Pdx1 en las condiciones con NO. Los resultados mostrados son la media del conteo celular de cinco campos visuales. El NO incrementa la expresión de Zic1 en mESC. Zic1 y Pdx1 co-expresan en las mismas células en +LIFNO y -LIFNO. +LIF (células cultivadas en presencia de LIF), +LIFNO (células cultivadas en presencia de LIF + 500 μ M DETA-NO), -LIF (células cultivadas en ausencia de LIF), -LIFNO (células cultivadas en ausencia de LIF + 500 μ M DETA-NO), durante 4 días.

4.2 Egr1 presenta un papel activador en la regulación de Zic1

Para determinar los factores de transcripción que tienen un sitio de unión en el promotor de Zic1 se empleó la base de datos Jaspar. Entre todos, se encontró un sitio de unión para Egr1 (GGCGAGGGTGGGGGGGGCGGG), unas 50pb aguas arriba del inicio de translación del gen Zic1, con un “score” 10.002 y un “relative score” 0.8587 (Figure 8, panel A). En estudios previos en el laboratorio analizamos los factores de transcripción que se unían al promotor de Pdx1 y el efecto del NO en su expresión. Se probó que sólo el factor de transcripción Egr1 no presentaba cambios en su expresión por el NO. Por ello se decidió estudiar el papel de este factor de transcripción en la regulación de Zic1.

Para determinar si Egr1 presenta un papel sobre la expresión de Zic1 se estudió la ocupación de Egr1 sobre el promotor de Zic1 mediante un ensayo Chip y los resultados fueron visualizados mediante una RT-PCR, mostrando que la ocupación de Egr1 incrementa tras el tratamiento con NO (Figura 8, panel B). Dado que en esta condición la expresión de Zic1 se incrementa, indica que Egr1 podría tener un papel activador en la expresión de Zic1. Para demostrar esto se desarrolló un ensayo de pérdida y ganancia de función de Egr1, donde los resultados revelaron que cuando Egr1 es sobre-expresado, la expresión de Zic1 incrementa significativamente (Figura 8, panel C); mientras que cuando Egr1 es silenciado, la expresión de Zic1 disminuye significativamente (Figura 8, panel D). Estos experimentos se realizaron en medio de cultivo con LIF y

presencia de DETA-NO, donde la ocupación de Egr1 en el promotor de Zic1 es mayor de acuerdo a los resultados obtenidos en el Chip.

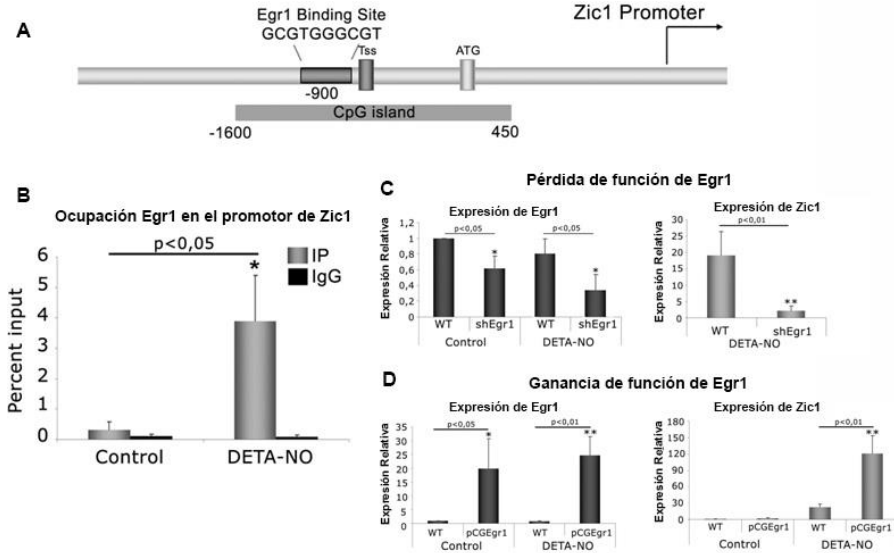


Figura 8. Papel de Egr1 en la regulación de Zic1. A) Esquema del promotor de Zic1: islas CpG (rectángulo horizontal gris), inicio de la transcripción (TSS) e inicio de traducción (ATG+1) representados por triángulos grises verticales; sitio de unión de Egr1 y su secuencia consenso en Zic1 (GGCGAGGGTGGGGGGGGGCGGG) de acuerdo con la base de datos Jaspár. B) Ensayo de Chip de Egr1 sobre el promotor de Zic1. La ocupación del promotor de Zic1 por Egr1 se incrementa tras el tratamiento con NO. Los resultados son la media de tres experimentos independientes. El eje de las Y corresponde al “percent input”. C) Ensayo de pérdida de función de Egr1. Las células fueron transfectadas con un pull de shEgr1 y seleccionadas con puromicina. La expresión de Egr1 y zic1 se determinó mediante RT-PCR. La expresión de Egr1 se analizó en las condiciones control y DETA-NO, mientras que Zic1 sólo en la condición DETA-NO, donde se supone que Egr1 está actuando. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β -actina, usada como control de carga, y analizado usando un algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Representa la media de tres experimentos independientes. D) Ensayo de ganancia de función de Egr1. Las células RIE fueron transfectadas temporalmente con pCG-Egr1-HA. La expresión de Egr1 y zic1 se determinó mediante RT-PCR. La expresión de ambos se analizó en las condiciones control y DETA-NO. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β -actina, usada como control de carga, y analizado usando un algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Representa la media de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un test de “T-student”: los valores * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ se consideraron significativos estadísticamente.

4.3 Zic1 se expresa en líneas de células beta pancreáticas y en islotes pancreáticos

Con el fin de confirmar nuestras sospechas de que Zic1 no es un gen exclusivo de ectodermos, sino que puede estar presente en células pancreáticas y podría estar involucrado en el proceso de diferenciación hacia endodermo, realizamos algunos ensayos en células adultas. Para ello llevamos a cabo ensayos de PCR y Western-Blot en células pancreáticas (MIN6) y en islotes adultos, los cuales revelaron que al igual que Pdx1, Zic1 se expresaba en estas células (Figura 9, paneles A y B). Como controles se emplearon células neurales (SH-SY5Y) y tejido de cerebro, donde se conoce que se expresa Zic1. Posteriormente desarrollamos un ensayo de inmunofluorescencia en células pancreáticas (INS1-E) y corroboramos que hay una co-expresión de Pdx1 y Zic1 en estas células (Figura 9, panel C). Finalmente, los ensayos de inmunofluorescencia realizados en tejidos adultos, en páncreas de ratón y en islotes disgregados confirmaron la co-expresión de Zic1 y Pdx1 en células de islote pancreático. (Figura 9, panel D). Como control de la expresión de Zic1 se hizo un ensayo de inmunofluorescencia en tejido de cerebro de ratón.

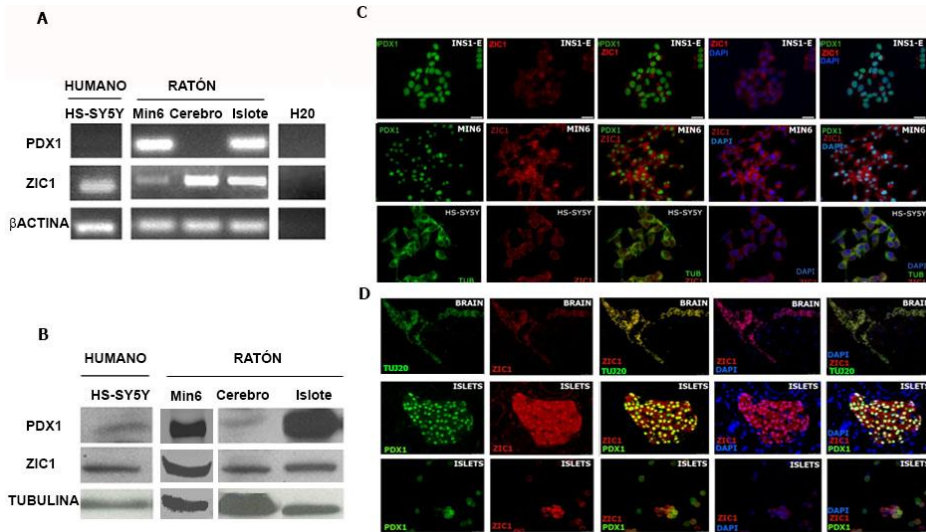


Figura 9. Análisis de la expresión de Zic1 en líneas de células beta pancreáticas y en islotes pancreáticos. **A)** PCR cualitativa de la expresión de Zic1 en células MIN6, islotes, tejido de cerebro y células HS-SY5Y. Se usó β-Actina como control de carga. Los resultados mostrados son los más representativos de tres experimentos. **B)** Western-Blot de Zic1 en células MIN6, islotes, tejido de cerebro y células HS-SY5Y. Se usó β-Actina como control de carga. Los resultados mostrados son los más representativos de tres experimentos. **C, D)** Ensayo de Inmunofluorescencia. Las imágenes muestran las células INS1-E, MIN6, HS-SY5Y, islotes y tejido de cerebro teñidos con DAPI (azul), Zic1 (rojo), y Pdx1 (verde). Barra de escala, 25 μM. Las imágenes mostradas son las más representativas de tres experimentos independientes. Las proteínas Zic1 y Pdx1 co-expresan en las mismas células. En los tres ensayos (A,B y C), Zic1 se expresa en las células MIN6 y en islotes de ratón. Expresión de Pdx1 como control de endodermo. Células HS-SY5Y y tejido se cerebro como control de ectodermo.

4.4 El tratamiento con NO modifica la vía de señalización de Shh en CMER

En los ensayos previos hemos comprobado que la expresión de Zic1 es regulada por el NO y que está presente en células pancreáticas. Dado que se ha descrito que Zic1 interacciona con las proteínas Gli y regula la vía de señalización Shh, hemos estudiado el efecto del NO en la regulación de la misma. Mediante PCR cuantitativa se ha

analizado la expresión de los genes involucrados en esta vía y los genes diana, Patched1, Gli1, Gli2, Gli3 y Nanog. Todos ellos presentaron una disminución en su expresión génica tras el tratamiento con NO (Figura 10). Sólo Gli3 mostró un leve aumento en su expresión, posiblemente la expresión de su forma trunca e inactiva. Con estos resultados se demostró que el tratamiento con altas concentraciones de NO en CMER está afectando a la vía de señalización Shh, disminuyendo la expresión de sus genes diana.

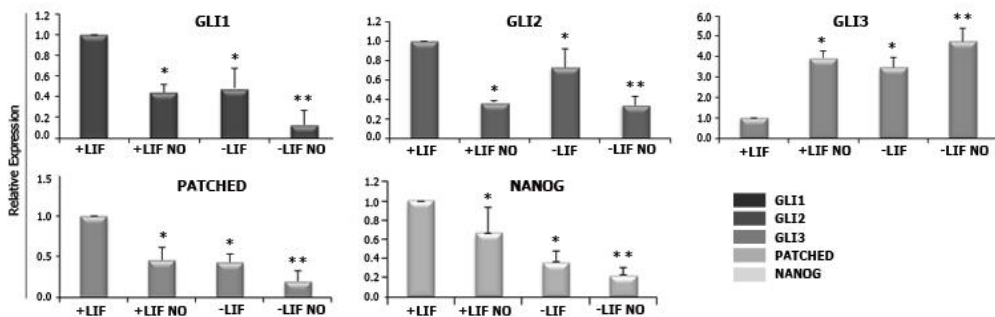


Figura 10. Análisis del efecto de NO en la expresión de los genes Diana de Shh en CMER. RT-PCR. El tratamiento con NO disminuye la expresión de Gli1, Gli2, Nanog y Patched en las condiciones +LIFNO y – LIF NO. Sólo Gli3 incrementa su expresión. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β -actina, usada como control de carga, y analizado usando un algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Representa la media de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un test de “T-student”: * $P < 0,05$ es estadísticamente significativo frente a células cultivadas en presencia de LIF, ** $P < 0,05$ frente a células cultivadas en presencia y ausencia de LIF. +LIF (células cultivadas en presencia de LIF), +LIFNO (células cultivadas en presencia de LIF + 500 μ M DETA-NO), -LIF (células cultivadas en ausencia de LIF), -LIFNO (células cultivadas en ausencia de LIF + 500 μ M DETA-NO), durante 4 días.

4.5 Posible papel de Zic1 en la inhibición de la vía Shh y proceso de diferenciación

Para comprobar si la modificación de la vía Shh en CME de ratón tras el tratamiento con NO es promovida por Zic1, llevamos a cabo un ensayo de ganancia de función, empleando células cultivadas en presencia de LIF y transfectadas con el plásmido pCDNA3.1-HIS Zic1 y con el vector vacío. La sobreexpresión de Zic1 se verificó mediante PCR cualitativa y Western-Blot (Figura 11, paneles A y B). La expresión de los genes diana de la vía Shh se estudió mediante una PCR cuantitativa, en la que los resultados revelaron que cuando la expresión de Zic1 aumenta, la expresión de los genes diana disminuye levemente y la expresión de Pdx1 no cambia, en las células transfectadas con el plásmido pCDNA3.1-His Zic1 (Figura 11, panel C). Finalmente, estudiamos la expresión de Zic1 y de los genes diana de la vía Shh en islotes de ratón, mediante ensayos de PCR en islotes en comparación con condiciones de no diferenciación en CME de ratón, comprobando que todos ellos reducían su expresión en islotes, mientras que Zic1 la incrementaba. (Figura 11, panel D).

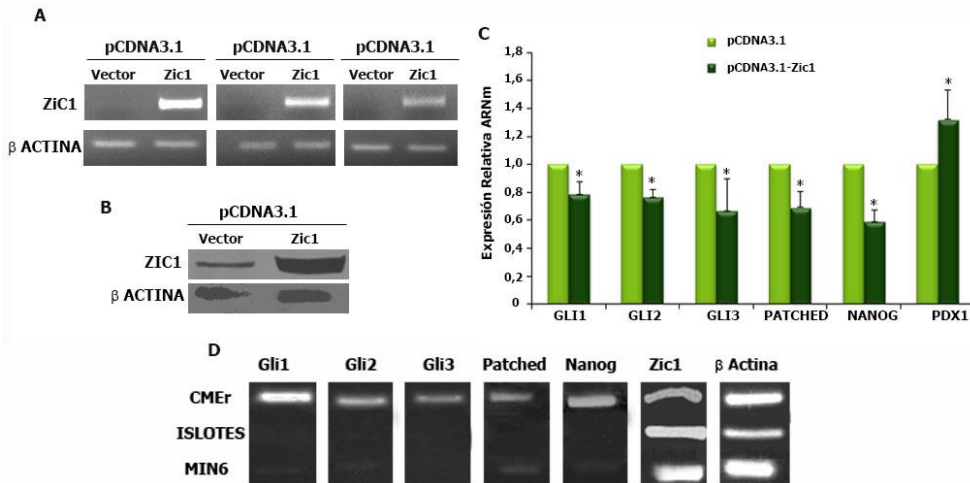


Figura 11. Ensayo de ganancia de función de Zic1 en CMEr. **A)** PCR cualitativa de células transfectadas con el plásmido pCDNA3.1-His Zic1 y células transfectadas con el vector vacío. Zic1 está siendo sobre-expresado. Se usó β-Actina como control de carga. Los resultados mostrados corresponden a los tres experimentos realizados. **B)** Western-Blot de las células transfectadas con el plásmido Zic y las transfectadas con el vector vacío, probando que Zic1 está siendo sobreexpresado. Se usó β-Actina como control de carga. Los resultados mostrados corresponden al más representativo de tres experimentos. **C)** PCR cuantitativa de Zic1, Gli1, Gli2, Gli3, Patched, Nanog y Pdx1 de células transfectadas con el plásmido de Zic1 pCDNA3.1-His. La expresión de Zic1 incrementa considerablemente, la expresión de los genes diana de Shh disminuye levemente, y la expresión de Pdx1 no cambia, en células transfectadas con el plásmido pCDNA3.1-His Zic1. El eje de la Y representa la expresión relativa. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β-actina, usada como control de carga, y analizado usando un algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un test de “T-student”: * $P < 0,05$ es estadísticamente significativo frente a células transfectadas con el vector vacío pCDNA3.1-His. **D)** PCR cualitativa. Análisis de la expresión de los genes Diana de la vía Shh en islotes y células pancreáticas adultas MIN6. Gli1, Gli2, Gli3, Patched y Nanog están silenciados en islotes y células pancreáticas adultas. Se empleó β-Actina como control de carga. Los resultados mostrados son los más representativos de tres experimentos.

Diseño y Optimización de un Medio de cultivo Químicamente Definido suplementado con bajas concentraciones de NO

4.6 Estudio del efecto del NO y medios definidos sobre Células Madre Embrionarias de ratón (CMER)

El factor inhibidor de leucemia recombinante (LIF) es imprescindible para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre embrionarias de ratón. Dado el alto coste de este componente, y que cada vez se requiere un mayor número de células para experimentos, nos propusimos optimizar el medio de cultivo disminuyendo la concentración de LIF, compensándolo con bajas concentraciones de DETA-NO. La finalidad de ello fue mantener la pluripotencia y proliferación celular y abaratar los costes, para lo cual se estudió el efecto del Óxido Nítrico sobre la línea de células madre embrionarias de ratón R1/E, variando tres parámetros en el cultivo de las mismas: Inóculo, concentración de LIF y concentración de DETA-NO.

El diseño experimental contempla la utilización de los tres factores más influyentes sobre el crecimiento celular en tres niveles: alto, medio y bajo, determinando de esta manera el nivel óptimo de cada variable independiente (Tabla4).

<i>Tabla 4. Matriz de diseño experimental para cultivo de CMEm R1E</i>					
Factor	Parámetro	-1	0	1	Control
X1	Inóculo	1000/cm ²	3000/cm ²	6000/cm ²	
X2	UnidadesLIF	250U/ml	500U/ml	750U/ml	1000U/ml
X3	DETA-NO	0,5 µM	2 µM	5 µM	0

Se obtuvieron resultados fiables para el cultivo de un inóculo de 3000 células/cm² durante 5 días. En primer lugar se midió la proliferación celular mediante incorporación de BrdU, mostrando que todas las condiciones estudiadas presentan una tasa de proliferación mayor al control, obteniéndose los valores más altos para 250 y 750 U de LIF (Figura13). Por otro lado se estudió el mantenimiento de la pluripotencia, para lo que se realizaron ensayos de PCR cuantitativa para determinar la expresión de marcadores de pluripotencia, concretamente Oct4 y Nanog. En los resultados se observó una expresión de Oct4 y Nanog muy similar a la expresión del control en todas las condiciones (Figura14). En el estudio estadístico, aquellas condiciones en las que no se obtienen resultados significativos respecto al control indican que sus valores son muy cercanos al del control, y por tanto son óptimas.

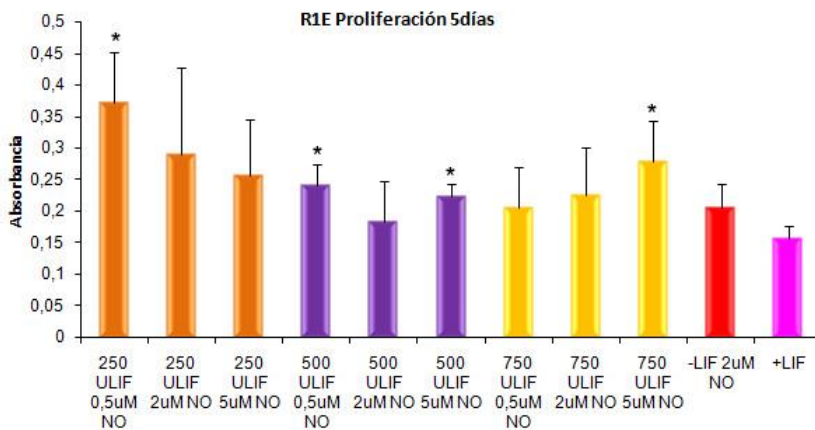


Figura 13. Medición de la proliferación celular por incorporación de BrdU. Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². El control aparece representado de color rosa. Se observa que es posible reducir la concentración de LIF suplementando con NO. Esta imagen representa la media de cuatro experimentos independientes. . Para el análisis estadístico se realizó un test de “T-student”: Valores con * $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto al control +LIF.

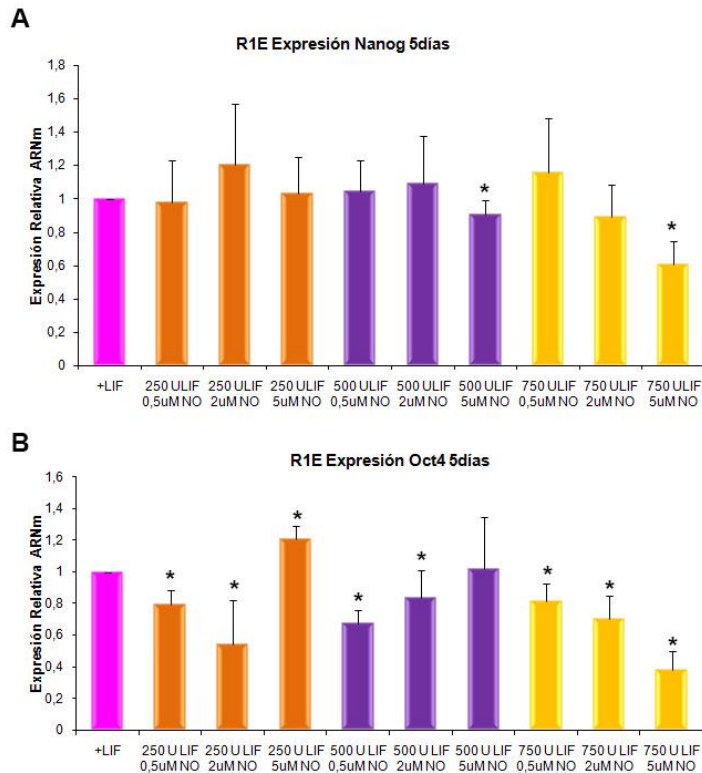


Figura 14. Medición de la expresión de marcadores de pluripotencia por PCR cuantitativa. A) Expresión de Nanog frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². B) Expresión de Oct4 frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². El control aparece representado de color rosa. Se observa que la expresión de Nanog y Oct4 es muy similar al control cuando se reduce la concentración de LIF y se suplementa con NO. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β -actina, usando el algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Esta imagen representa la media de cuatro experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un test de “T-student”: valores con $*P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto a +LIF.

Por lo tanto, reduciendo la concentración de LIF del medio de cultivo para las células troncales embrionarias de ratón hasta un 75% y suplementándolo con 2 μ M del donador de Óxido Nítrico DETA-NO se puede obtener condiciones de proliferación celular y de pluripotencia similares al medio control con 100% de LIF.

4.7 Estudio del efecto del Óxido Nítrico y la reducción de bFGF en medios tradicionales sobre Células Madre Embrionarias humanas (CMEh)

El bFGF es un componente crítico en el cultivo de células madre embrionarias humanas, siendo necesario para el mantenimiento del estado indiferenciado de las mismas. Así, reducir la concentración de bFGF y en consecuencia el costo se convierte en un paso crítico en la optimización de un medio de cultivo químicamente definido. Por lo tanto, la primera tarea que nos planteamos fue disminuir la concentración de bFGF en el medio de cultivo, compensándolo con bajas concentraciones de DETA-NO, con la finalidad de mantener la pluripotencia, la proliferación y abaratar los costes. Para ello se estudió el efecto del NO sobre la línea de células madre embrionarias humanas HS181, variando tres parámetros en el cultivo de las mismas: inóculo, concentración de bFGF y concentración de DETA-NO, como se muestra en la Tabla 5.

<i>Tabla 5. Diseño experimental de las condiciones de cultivo de las CMEh- HS 181</i>					
Factor	Parámetro	-1	0	1	Control
X1	Inóculo	1·10 ⁴	3·10 ⁴	6·10 ⁴	
X2	bFGF	-bFGF	12,5% 25%	50% 75%	-bFGF,50%,100%
X3	DETA-NO	0,5 µM	2 µM	5 µM	0

Los experimentos fueron realizados tanto en medio condicionado con fibroblastos como en medio sin condicionar, siendo el control positivo los cultivos con 8 ng/mL de bFGF y el control negativo los cultivos sin bFGF.

El modelo experimental seguido fue el mismo llevado a cabo con las células de ratón, midiéndose la proliferación celular por la incorporación de BrdU, y la pluripotencia por la expresión del marcador de pluripotencia Nanog por PCR Cuantitativa.

En cuanto a la proliferación (Figura 15), se ha comprobado que reduciendo la concentración de bFGF al 25%, 12,5% e incluso por completo en el medio de cultivo se obtienen niveles cercanos a los del cultivo control, con un suplemento de DETA-NO comprendido entre 0,5 y 5 μ M. Sin embargo, las condiciones de proliferación más óptimas fueron con 50% y 75% de bFGF, siendo la más óptima 50% de bFGF y 2 μ M de DETA-NO. Por otro lado, la medición de los niveles de expresión de Nanog mediante PCR Cuantitativa es muy similar al control en todas las condiciones (Figura16).

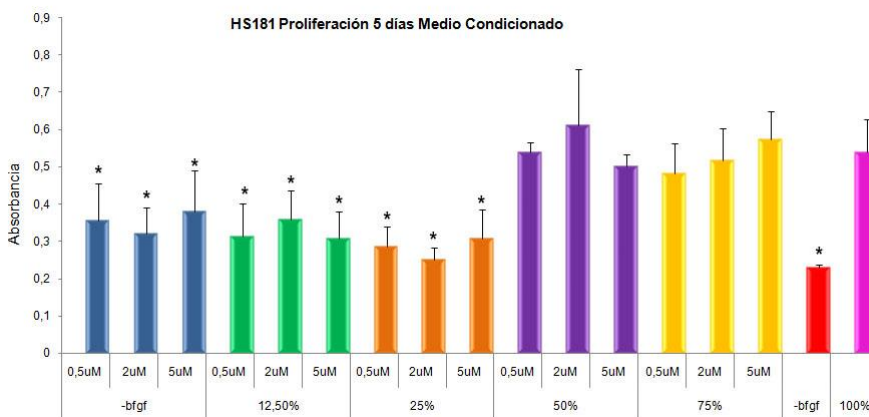


Figura 15. Medida de la proliferación celular por incorporación de BrdU. Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². El control aparece representado de color rosa. La proliferación se mantiene cuando se reduce la concentración de bFGF y se suplementa con NO. Esta imagen representa la media de cuatro experimentos independientes. Valores con * $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto a 100%.

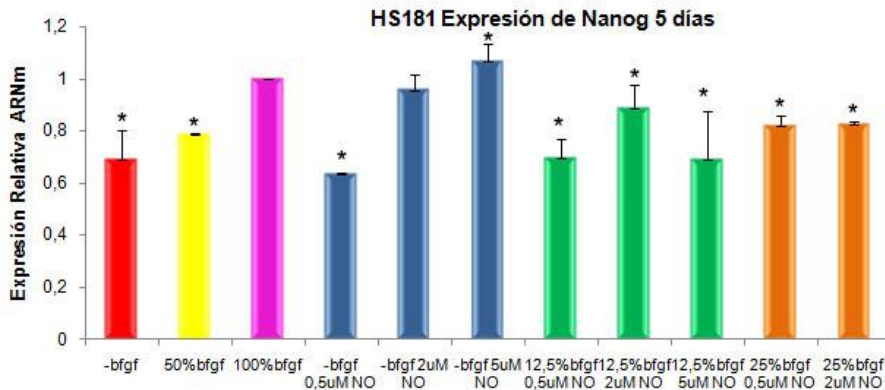


Figura 16. Medida de la expresión de marcadores de pluripotencia por PCR cuantitativa. Expresión de Nanog frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². El control aparece representado de color rosa. La expresión de Nanog se mantiene muy cercana al control cuando se reduce la concentración de bFGF y se suplementa con NO. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β -actina, usando el algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Esta imagen representa la media de tres experimentos independientes. Valores con * $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto a 100% bFGF.

Por tanto, podemos concluir que adicionando el donador de óxido nítrico DETA-NO a una concentración de 2 y 5 μ M es posible reducir la concentración de bFGF al 75, 87,5%, e incluso por completo, manteniendo una tasa de proliferación y de expresión de Nanog similar al control. Los resultados más concluyentes se obtuvieron para el cultivo de un inóculo de 3000 células/cm² durante 5 días con medio condicionado. Sin embargo en los experimentos con medio sin condicionar no se lograron resultados satisfactorios, ya que los resultados de proliferación no representan una mejora en las condiciones de cultivo por parte del NO.

4.8 Estudio de un medio químicamente definido libre de suero sobre Células Madre Embrionarias humanas (CMEh)

Uno de los mayores retos para el uso clínico de las células troncales es la exposición a productos derivados de animales no definidos en el medio durante el cultivo y la expansión celular. Hoy en día se ha reemplazado el uso de suero fetal bovino con el sustituto de suero Knock-out (KO-SR, Invitrogen) y las células “feeder” humanas han reemplazado a los fibroblastos embrionarios de ratón para la derivación y expansión de hESCs e iPSCs. La finalidad del siguiente estudio es la obtención de un medio de cultivo químicamente definido ausente de suero animal para el cultivo de células madre embrionarias humana, al cual llamaremos MQD-CABIMER (MQD-C), y al cual iremos variando las concentraciones de bFGF y DETA-NO hasta encontrar la condición más óptima. Para los experimentos, se consideraron aquellas condiciones de cultivo óptimas obtenidas de los experimentos previos (tabla6).

<i>Tabla 6. Diseño experimental de las condiciones de cultivo de células pluripotentes humanas en medio químicamente definido MQD-CABIMER</i>					
Factor	Parámetro	-1	0	1	Control
X1	bFGF	-bFGF	12,5%	25%	Medio Cond -bFGF Medio Cond 100% bFGF E8 Comercial MQD-100% bFGF
X2	DETA-NO	0,5 µM	2 µM	5 µM	

Este estudio se basó en los siguientes experimentos:

- Comparación de la morfología celular de los distintos tratamientos con respecto al control, mediante documentación fotográfica.
- Medición de la proliferación celular, la cual se determinó por la incorporación de BrdU mediante el Kit “Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric, Roche).
- Medición de la proliferación celular por exclusión por azul de Trypan.
- Medición de la pluripotencia por la expresión de los marcadores de pluripotencia Nanog y Oct4 mediante PCR Cuantitativa.

En primer lugar se observó la morfología y densidad celular (Figura 17), comprobándose que la morfología del medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF es muy similar al medio comercial E8, pero en ambos casos disminuye considerablemente la densidad celular con respecto al medio condicionado con fibroblastos (medio control). En cuanto a las condiciones con concentraciones de bFGF reducida observamos que la densidad celular disminuye y la morfología varía con respecto al medio control y al medio comercial.

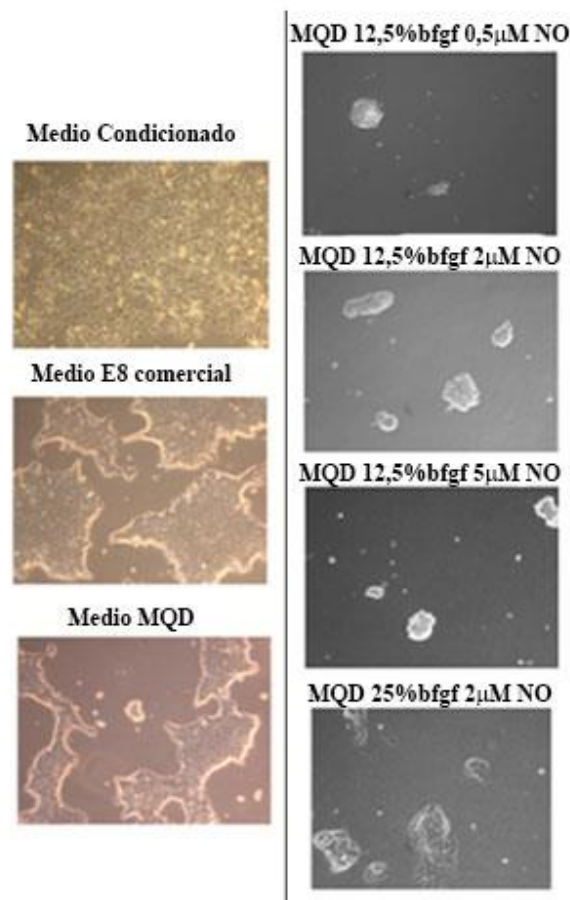


Figura 17. Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos. Morfología y densidad celular de condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². La densidad celular disminuye con respecto al control Medio Condicionado, y en el medio MQD con concentración de bFGF reducida y suplementada con NO varía la morfología celular. MQD (Medio químicamente definido).

Con respecto a la proliferación celular los resultados mostraron una baja tasa de proliferación para los medios MQD-CABIMER con bajas concentraciones de bFGF. Sin embargo, con el medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF se obtiene una alta tasa de proliferación celular, incluso mayor a la obtenida con medio

condicionado. La proliferación por conteo se corroboró con aquella cuantificada por incorporación de BrdU (Figura 18), donde se observa que la proliferación disminuye muchísimo con el medio MQD-C con respecto al medio condicionado. Sin embargo, en este caso observamos que el medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF presenta la tasa de proliferación más baja, demostrando así que el tratamiento con óxido nítrico entre 2 y 5 μ M disminuye la dependencia de bFGF, mejorando en algunos casos la proliferación con respecto a los valores del medio E8 comercial, concretamente con una concentración de bFGF de un 25% y 2 μ M de NO.

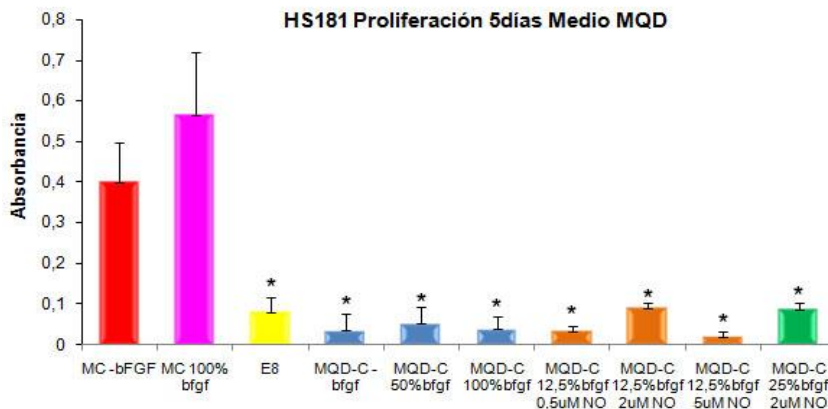


Figura 18. Medición de la proliferación celular por incorporación de BrdU. Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². El control aparece representado de color rosa. Cuando la concentración de bFGF es reducida y suplementada con NO, la proliferación disminuye con respecto al control, pero se mantiene con respecto al medio comercial E8. Esta imagen representa la media de tres experimentos independientes. “T-Student”: valores con * $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto a MC 100% bFGF. MC (Medio Condicionado), MQD-C (Medio químicamente definido-CABIMER).

Finalmente, se midieron los niveles de expresión de marcadores de pluripotencia, concretamente de Nanog y Oxford, en el

medio con el que se obtuvo una mayor proliferación, MQD-CABIMER 25% de bFGF y 2uM de NO (Figura 19). Dichos resultados mostraron que la expresión de ambos marcadores se incrementaba en las células cultivadas con dicho medio, con respecto a aquellas cultivadas con medio condicionado y medio comercial E8.

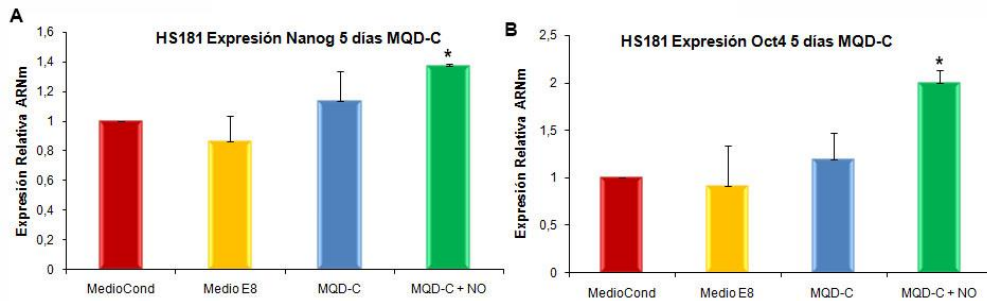


Figura 19. Medición de la expresión de marcadores de pluripotencia por PCR cuantitativa. A) Expresión de Nanog frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². B) Expresión de Oct4 frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². El control aparece representado de color rojo. La expresión de Nanog y Oct4 se mantiene e incluso aumenta cuando se reduce la concentración de bFGF y se suplementa con NO. Los valores fueron normalizados a los valores de expresión de la β -actina, usando el algoritmo $\Delta\Delta Ct$. Esta imagen representa la media de tres experimentos independientes. Valores con * $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto a MC 100% bFGF.MC (Medio Condicionado), MQD-C (Medio químicamente definido-CABIMER).

Por lo tanto, podemos concluir que el medio MQD-CABIMER, libre de suero, con una concentración de bFGF de un 25% y en presencia de DETA-NO a una concentración de 2uM, mantiene la pluripotencia de las células madre embrionarias humanas, con el inconveniente de que se reduce la tasa de proliferación y supervivencia celular con respecto al medio control. Los resultados más concluyentes se obtuvieron para el cultivo de un inóculo de 3000 células/cm² durante 6 días.

4.9 Estudio del efecto del NO y medios definidos sobre Células Madre Mesenquimales humanas de Tejido Adiposo (PCS 500-011)

Actualmente, se están llevando a cabo multitud de ensayos clínicos que implican el uso de células CMMh, ya que son el candidato principal de células madre humanas para el cultivo a gran escala, gracias a su fácil aislamiento, multipotencia, capacidad de autorrenovación y proliferación, eficacia terapéutica, propiedades inmunosupresoras, y capacidad de diferenciarse hacia las líneas condrogénica, adipogénica y osteogénica. Una cuestión muy importante a tener en cuenta en los cultivos a gran escala con propósitos terapéuticos es el uso de sueros derivados de animales y otros componentes que incrementan los costes de producción, así como el posible riesgo de transmisión de patógenos a los humanos. De esta forma, el propósito de este estudio fue optimizar un medio de cultivo químicamente definido libre de suero y suplementado con DETA-NO, con la finalidad de mantener la pluripotencia y la proliferación y abaratar los costes. Este estudio se ha dividido en cuatro partes consecutivas hasta obtener el objetivo propuesto, analizando en cada caso la proliferación celular por incorporación de BrdU y conteo celular, las características fenotípicas por Citometría de flujo, la morfología celular por toma de fotos, y finalmente el potencial de diferenciación hacia las tres líneas germinales.

4.9.1 Reducción de la concentración de suero fetal bovino

La primera parte del estudio consistió en reducir la concentración de suero fetal bovino del medio de cultivo reduciendo su concentración a un 25, 50 y 75%, y suplementándolo con bajas concentraciones de DETA-NO: 2, 5 y 10 μ M. Los resultados mostrados corresponden a un cultivo de un inóculo de 5000 células/cm² durante 7 días.

En cuanto a la proliferación (Figura 20), se ha comprobado que todas las condiciones estudiadas son satisfactorias, obteniéndose niveles de proliferación muy similares al control (DMEM 10%). Pudimos observar que la condición más óptima, con una mayor proliferación, se obtiene con un **5% de suero fetal bovino en el medio de cultivo y suplementado con 5 μ M de DETA-NO**.

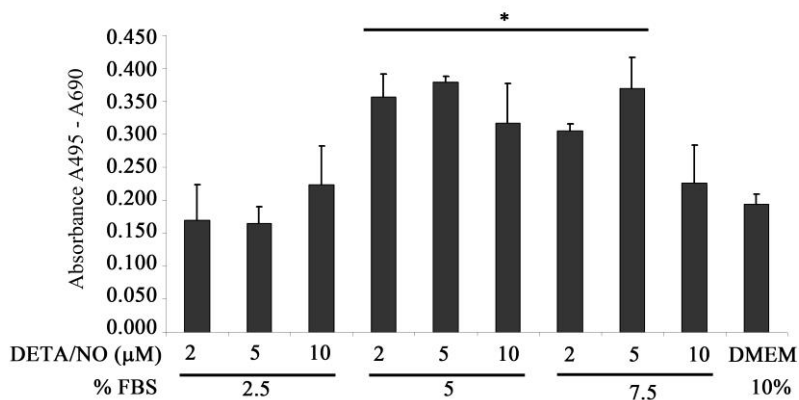


Figura 20. Análisis de la proliferación celular por incorporación de BrdU. Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 5000 células/cm². El control aparece nombrado como “DMEM10%”. Cuando la concentración de suero es reducida y suplementada con NO, la proliferación celular se mantiene con respecto a las células cultivadas con el medio control. Esta imagen representa la media de tres experimentos independientes. “T-Student”: valores con * $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto a DMEM 10%. % FBS (% Suero Fetal Bovino). DETA/NO (Concentración de óxido nítrico).

Por otro lado, se estudió el mantenimiento de las características fenotípicas y de potencia de las células mesenquimales humanas para la condición más óptima determinada en el experimento anterior (5% de suero + 5 μ M) en comparación con el medio control (Figura 21), observándose que nuestro medio sigue un patrón casi idéntico al control, con la ventaja de que estamos reduciendo la concentración de suero fetal bovino al 50%.

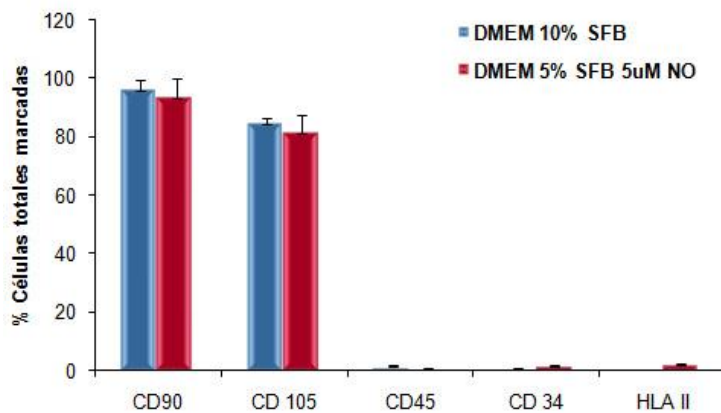


Figura 21. Análisis del fenotipo por Citometría de flujo. Porcentaje total de células que expresan cada anticuerpo en una población de 5000 células/cm². El control aparece nombrado como “DMEM 10%”(azul). Cuando la concentración de suero es reducida al 5% y suplementada con 5 μ M de NO (rojo) el patrón fenotípico se mantiene similar al del control. Esta imagen representa la media de tres experimentos independientes. SFB (Suero Fetal Bovino). NO (Óxido nítrico).

En cuanto a la morfología, pudimos observar tomando fotografías, que las células madre mesenquimales de tejido adiposo cultivadas con un medio de cultivo compuesto por un 5% de SFB y suplementado con 5 μ M mantenían una morfología muy similar a las cultivadas con el medio control (10% SFB), observándose además que la densidad celular es igual de elevada en ambas placas (Figura 22).

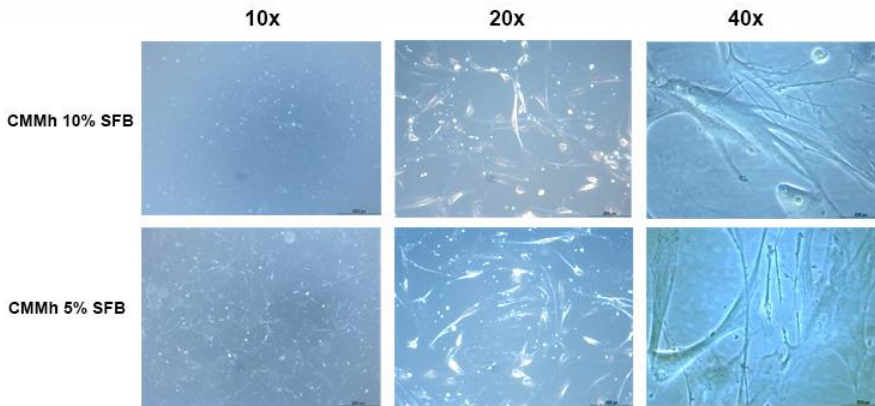


Figura 22. Análisis de la morfología y densidad celular por toma de imágenes. Morfología y densidad celular de condiciones de optimización en una población de 5000 células/cm². Imágenes tomadas en tres aumentos 10, 20 y 40. Cuando la concentración de suero es reducida al 5% se mantiene una morfología y densidad celular muy similar a las cultivadas en medio control (10% SFB). CMMh (Células madre mesenquimales humanas), SFB (Suero Fetal Bovino).

Además se estudió el mantenimiento de la proliferación celular mediante el análisis de Ki-67, proteína nuclear necesaria para la proliferación celular, comprobándose que las células cultivadas con el medio seleccionado presentaban una mayor expresión de dicha proteína (Figura 23).

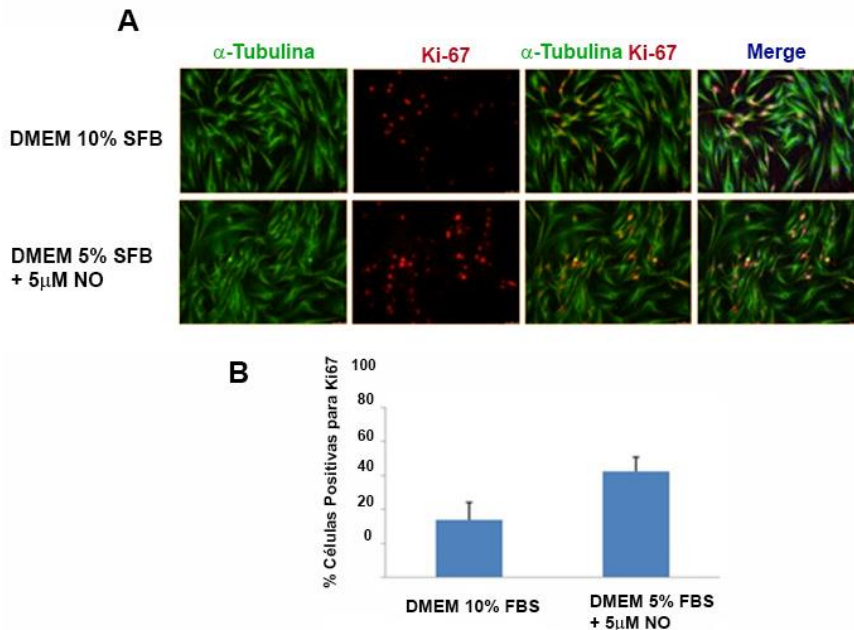


Figura 23. Análisis de la proliferación celular por estudio de Ki-67 mediante inmunofluorescencia. A) La expresión de Ki-67 fue analizada por un ensayo de inmunofluorescencia. Las imágenes muestran células cultivadas en el medio control (DMEM 10% SFB) y en el medio con suero reducido y posteriormente teñidas con DAPI (azul), Ki-67 (rojo) y α -TUBULINA (verde). Escala de 25 μ M. Las imágenes mostradas son las más representativas de tres experimentos. B) Cuantificación de las células que expresan Ki-67 en el medio control y en el medio con concentración de suero reducida al 5% y suplementado con 5 μ M de DETA-NO. Los resultados mostrados son la media del conteo celular de cinco campos visuales de cada experimento. Se observa mayor expresión de Ki-67 en las células cultivadas con 5% de SFB suplementado con NO. SFB (Suero Fetal Bovino), NO (Óxido Nítrico).

Finalmente se confirmó la viabilidad y calidad celular estudiando el potencial de diferenciación de las células al final del cultivo (Figura 24), comprobándose que las células madre mesenquimales de tejido adiposo cultivadas con medio compuesto por 5% de suero fetal bovino y 5 μ M de NO mantenían la capacidad para diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos.

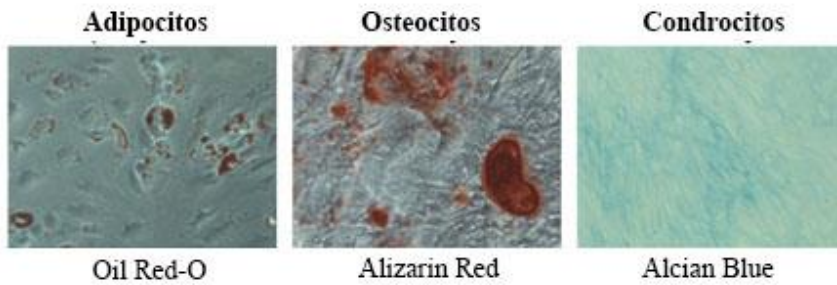


Figura24. Análisis del potencial de multilineaje. Las imágenes muestran la formación de adipocitos, osteocitos y condrocitos a partir de células madre mesenquimales cultivadas en medio de cultivo con concentración de suero reducida al 5% y suplementado con 5 μ M de DETA-NO.

Por tanto, podemos concluir que adicionando el donador de óxido nítrico DETA-NO a una concentración de 5 μ M es posible reducir la concentración de suero fetal bovino en el medio de cultivo a un 5%, manteniendo una tasa de proliferación, características fenotípicas, morfología y capacidad de diferenciación hacia las líneas germinales similares e incluso mejores al control.

4.9.2 Estandarización de un medio químicamente definido libre de suero

A continuación, procedimos a estandarizar un medio químicamente definido con el fin de retirar por completo el suero fetal bovino y evitar así la exposición de las células troncales a productos derivados de animales no-definidos en el medio durante el cultivo y la expansión celular. Dicho medio contendrá el factor de crecimiento bFGF a una concentración de 0,1 μ g/ μ l, necesario para mantener el estado indiferenciado de las células madre humanas. Además se llevó

a cabo el estudio de otros componentes en el medio de cultivo que mejoren la adhesión, proliferación y fenotipo de las células madre mesenquimales. Concretamente, se estudió el efecto del factor de crecimiento TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), el cual se ha descrito que regula la proliferación y diferenciación celular y la homeostasis de tejidos; y de otros aditivos de los medios, como son aminoácidos no esenciales, glutamina y piruvato. Los resultados mostrados corresponden a un cultivo de un inóculo de 5000 células/cm² durante 7 días.

Las condiciones de cultivo estudiadas fueron las siguientes:

- Medio control de CMMh con 10% de SBF
- Medio químicamente definido comercial StemPro
- Medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF y TGF- β 2 μ g/ μ l
- Medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF, TGF- β 2 μ g/ μ l, Glutamina y Aminoácidos No Esenciales.
- Medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF, TGF- β 2 μ g/ μ l, Glutamina, Aminoácidos No Esenciales y Piruvato.
- Medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF, Glutamina y Aminoácidos No Esenciales
- Medio MQD-CABIMER con 100% de bFGF, Glutamina, Aminoácidos No Esenciales y Piruvato.

El primer paso fue el estudio de la proliferación celular de las células CMM humanas cultivadas en los distintos medios de cultivo. Los resultados mostraron que con todos los medios de cultivo de estudio se obtenía un número total de células mayor al obtenido con el medio comercial StemPro, y que de entre todos ellos el que presentó un número total de células más elevado y cercano al medio control fue el medio libre de suero con adición de los factores de crecimiento bFGF (0,1µg/µl) y TGF-β (2µg/µl). Además, se analizó el tiempo de doblaje celular "doubling time", el cual es un factor relevante al momento de diseñar la optimización de medios de cultivos para células mesenquimales, ya que existen evidencias reportadas sobre el aumento en el tiempo de "doubling time" conforme aumenta el número de pases. Se comprobó que la composición del medio en la que las células obtenían una tasa de proliferación más cercana al control **0,1µg/µl de bFGF y 2 µg/µl de TGF-β**, coincidía con un menor "doubling time", con un valor en torno a 5 días, muy similar al del control (Figura 25); mientras que el medio StemPro presentaba un valor de "doubling time" muy elevado. Hemos comprobado que en cuanto a proliferación celular, nuestro medio químicamente definido es mucho mejor que el medio comercial "Stem-Pro", el cual presenta una baja tasa de proliferación y un "doubling time" en torno a 35 días.

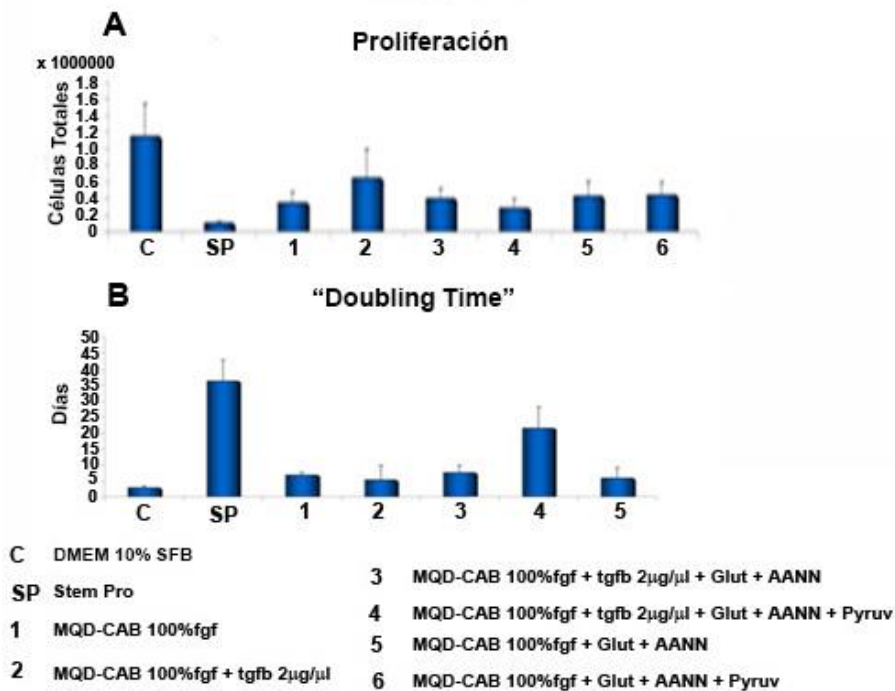


Figura 25. Análisis de la proliferación celular por conteo del número de células totales. A) Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². B) Número de día de doblajes frente a condiciones de optimización en una población de 3000 células/cm². Observamos que con la condición 2 se obtiene una tasa de proliferación más cercana al control y un menor "doubling time". El control aparece representado con la letra C. En la leyenda se indica la composición de los medios de cultivo. Esta imagen representa la media de tres experimentos independientes. SFB (Suero Fetal Bovino), MQD-C (Medio Químicamente Definido-CABIMER), Glut (Glutamina), AANN (Aminoácidos no esenciales), Pyruv (Piruvato).

Por otro lado, se estudió el mantenimiento de las características fenotípicas y de potencia de las células mesenquimales humanas cultivadas con cada uno de estos medios, en comparación con el medio control (Figura 26), observándose que el medio con **100% de bFGF y 2 µg/µl de TGF-β** presentaba el patrón más similar al control.

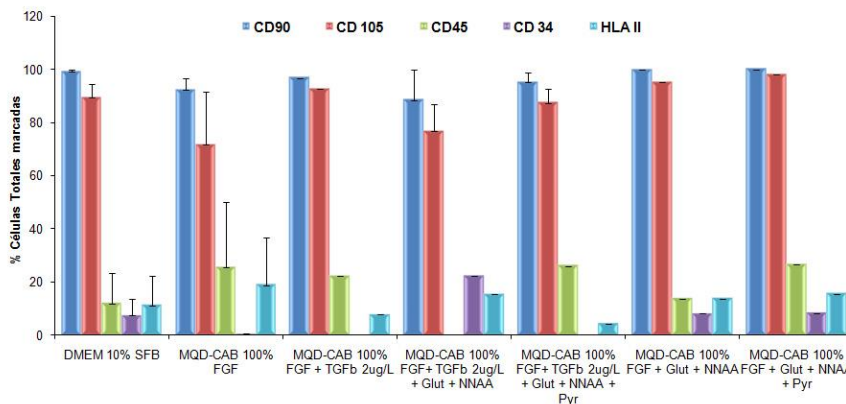


Figura 26. Análisis del fenotipado por Citometría de flujo. Porcentaje total de células que expresan cada anticuerpo en una población de 5000 células/cm². El control aparece nombrado como “DMEM10% SFB”. El medio con 100% de bFGF y 2 µg/µl de TGF-β presentaba el patrón más similar al control. Los resultados mostrados son la media de entre tres y un experimentos independientes. SFB (Suero Fetal Bovino). MQD-C (Medio Químicamente Definido-CABIMER), Glut (Glutamina), AANN (Aminoácidos no esenciales), Pyruv (Piruvato).

Para finalizar se observó la morfología de las células mesenquimales cultivadas con cada uno de dichos medios, comparándolos con el medio control (10% de SFB) y con los medios comerciales Stem-Pro y TeSR-E8 (Figura 27). Comprobamos que al añadir TGF-β la densidad celular aumentaba, y la morfología era más similar al control. Sin embargo, en el cultivo con los medios comerciales, sobre todo con Stem-Pro, la densidad celular era menor y variaba la morfología celular con respecto al control.

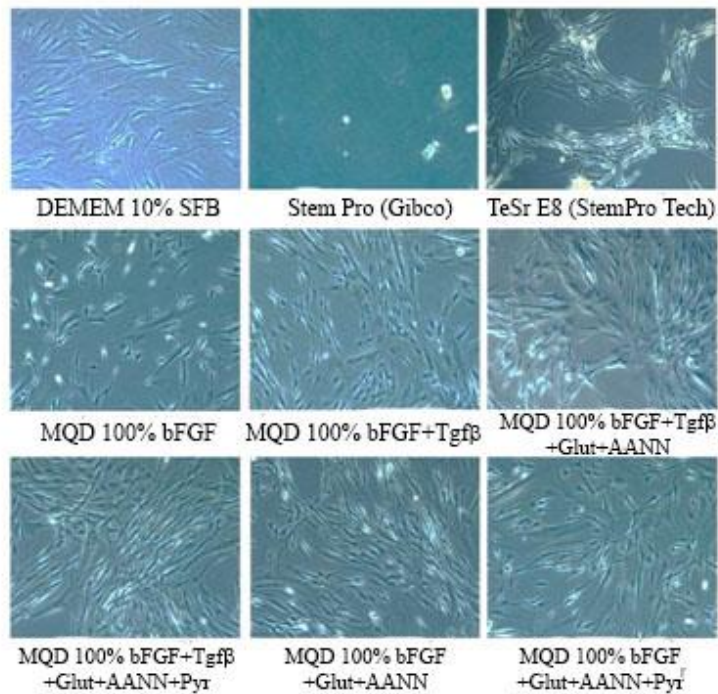


Figura 27. Análisis de la morfología y densidad celular por toma de imágenes. Morfología y densidad celular de condiciones de optimización en una población de 5000 células/cm². Se observa una densidad alta y morfología similar al control (DMEM 10% SFB) en los medios MQD. SFB (Suero Fetal Bovino). MQD (Medio Químicamente Definido), Glut (Glutamina), AANN (Aminoácidos no esenciales), Pyr (Piruvato).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de pluripotencia, fenotipado y morfología, conseguimos estandarizar un medio químicamente definido libre de suero, el cual requiere de los factores de crecimiento bFGF y TGF- β .

4.9.3 Efecto del Óxido Nítrico en el medio químicamente definido

El objetivo de este paso fue estudiar el efecto del NO en el medio libre de suero, dado que el uso de dicha molécula a bajas concentraciones se ha reportado como una alternativa en el cultivo de células madre, jugando un importante papel en el mantenimiento de la pluripotencia y la supervivencia. Queremos aprovechar esta ventaja del NO para reducir la concentración de bFGF en el medio de cultivo, y tratar así de reducir el alto coste de este factor de crecimiento necesario para mantener el estado indiferenciado de las células madre humanas. Por tanto procedimos a reducir la concentración de bFGF en el medio de cultivo a un 25, 50 y 75%, suplementándolo con DETA-NO, y analizando el efecto del mismo. Los resultados mostrados corresponden a un cultivo de un inóculo de 6000 células/cm² durante 7 días.

En primer lugar se estudió la proliferación celular (Figura 28), observándose una mayor tasa de proliferación para las células cultivadas en un medio con **75% de bFGF y 2 μ M de DETA-NO**. Además para esta condición se obtuvo un menor “doubling time”, menor a 5 días, que para el resto de condiciones. Sorprendentemente, las células cultivadas con el medio comercial Stem-Pro mostraron una tasa de proliferación muy baja, y un “doubling time” muy alto.

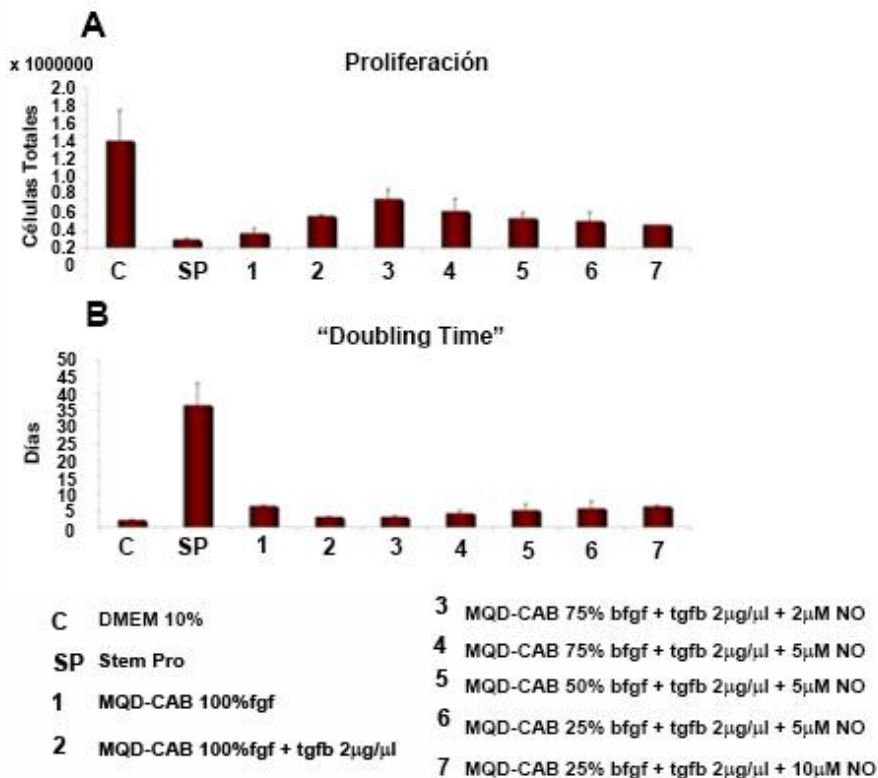


Figura 28. Análisis de la proliferación celular por conteo del número de células totales. A) Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 6000 células/cm². B) Número de día de doblajes frente a condiciones de optimización en una población de 6000 células/cm². Observamos que con la condición 3 se obtiene una tasa de proliferación más cercana al control (DMEM 10% SFB) y un menor "doubling time". El control aparece representado con la letra C. En la leyenda se indica la composición de los medios de cultivo. Esta imagen representa la media de tres experimentos independientes. MQD-CAB (Medio Químicamente Definido-CABIMER), NO (Óxido Nítrico).

Se procedió al análisis del mantenimiento de las características fenotípicas y de potencia de las células mesenquimales humanas cultivadas con cada una de las condiciones, comparándolo con el medio control (Figura 29). Se comprobó que las células que presentaban un patrón fenotípico más similar al del control fueron las

cultivadas en el medio químicamente definido con 75% de bFGF suplementado con 2 μ M de DETA-NO, y las cultivadas con 50% de bFGF suplementado con 5 μ M.

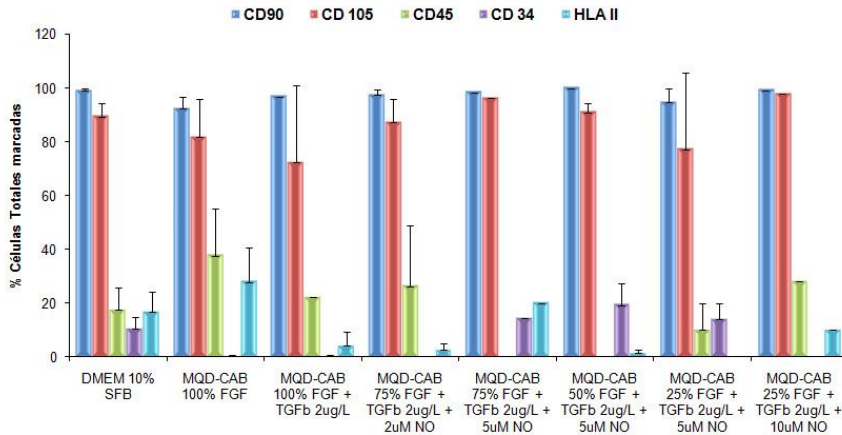


Figura 29. Análisis del fenotipado por Citometría de flujo. Porcentaje total de células que expresan cada anticuerpo en una población de 6000 células/cm². El control aparece nombrado como “DMEM 10% SFB”. Los patrones mas similares al control se obtienen para las condiciones 75% bFGF + 2 μ M NO y 50% bFGF + 5 μ M NO. Los resultados mostrados son la media de entre 2 y 3 experimentos independientes. SFB (Suero Fetal Bovino). MQD-CAB (Medio Químicamente Definido-CABIMER), NO (Óxido Nítrico).

En cuanto a la morfología, pudimos observar tomando fotografías, que las células madre mesenquimales de tejido adiposo cultivadas con el medio químicamente definido libre de suero mantenía la morfología, siendo la densidad celular al final del cultivo mayor en las células cultivadas con 50% y 75% de bFGF (Figura 30).

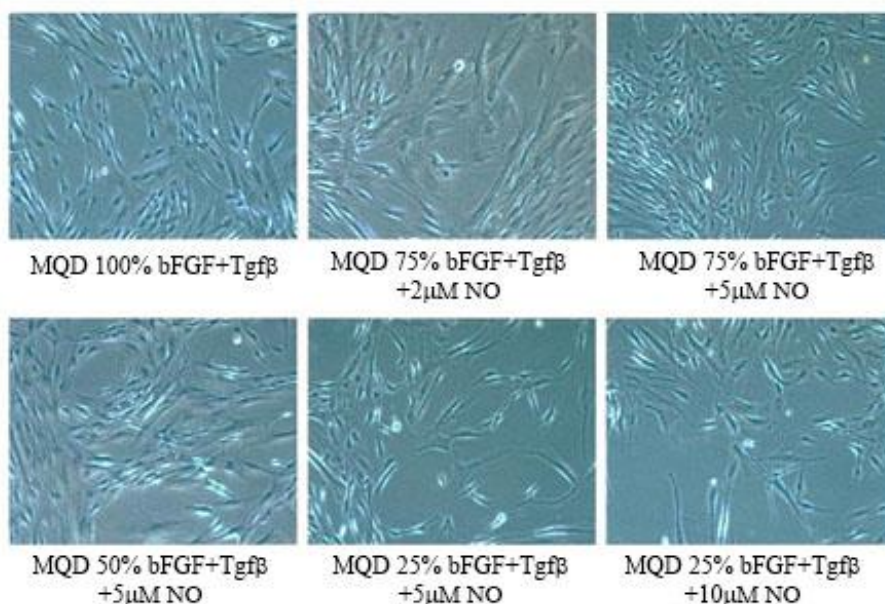


Figura 30. Análisis de la morfología y densidad celular por toma de imágenes. Morfología y densidad celular de condiciones de optimización en una población de 6000 células/cm². Se observa que se mantiene la morfología y que la mayor densidad celular se obtiene en las condiciones 75% y 50% bFGF. MQD (Medio Químicamente Definido), NO (Óxido Nítrico).

Con el fin de determinar qué condición es más óptima, si 75% de bFGF + 2 μ M de DETA-NO o 50% de bFGF + 5 μ M de DETA-NO, procedimos a hacer una comparativa de ambos (Figura 31), donde comprobamos que la morfología y la densidad celular era similar en ambos, pero que el patrón fenotípico era más óptimo para la primera condición, sobre todo en los marcadores negativos.

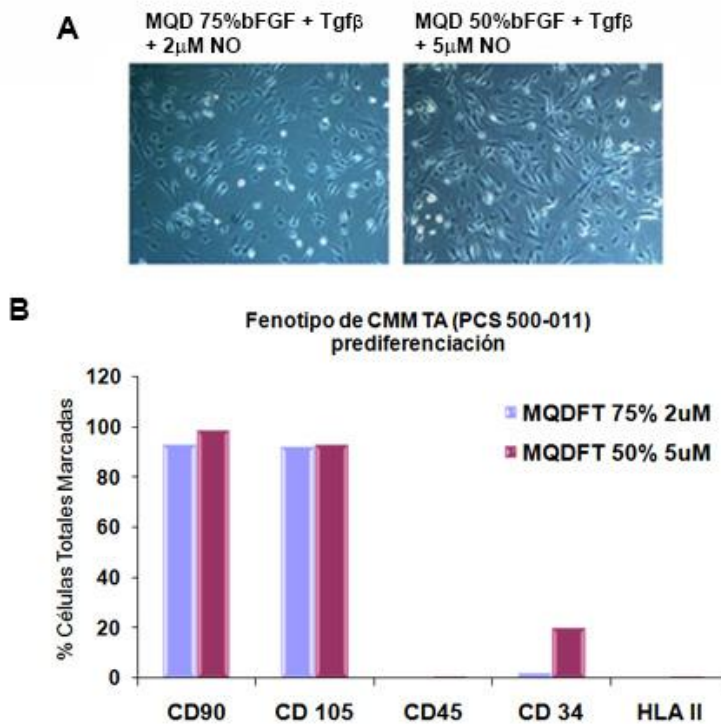


Figura 31. Análisis comparativo entre dos medios seleccionados. A) Análisis de la morfología y densidad celular por toma de imágenes. La morfología y densidad celular es similar en ambas condiciones. **B)** Análisis del fenotipado por Citometría de flujo. Porcentaje total de células que expresan cada anticuerpo en una población de 5000 células/cm². Se obtiene un mejor patrón fenotípico en las células cultivadas con 75% de bFGF y 2μM de NO. MQDFT 75% 2μM (Medio Químicamente Definido + bFGF (75%) + TGF-β + 2μM NO), MQDFT 50% 5μM (Medio Químicamente Definido + bFGF (50%) + TGF-β + 5μM NO).

Para finalizar se determinó la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales humanas de tejido adiposo cultivadas con el medio químicamente definido con un 75% de bFGF y 2 μM de DETA-NO al final del cultivo (Figura 32), comprobándose que mantenían el potencial para diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos.



Figura 32. Análisis del potencial de multilineaje. Las imágenes muestran la formación de adipocitos, osteocitos y condrocitos a partir de células madre mesenquimales de tejido adiposo cultivadas en un medio químicamente definido libre de suero, con 75% de bFGF y suplementado con 2 μ M de DETA-NO.

En base a los resultados mostrados podemos confirmar la optimización de un medio químicamente definido libre de suero, que requiere de los factores de crecimiento bFGF y TGF- β , reduciéndose la concentración del primero a un 75%, y suplementándose con una concentración de DETA-NO de 2 μ M. Dicho medio mantiene una tasa de proliferación, características fenotípicas, morfología y capacidad de diferenciación similares al control. Sin embargo, el cultivo de las células con dicho medio presentaba un inconveniente, y es que el cultivo no era acumulativo, es decir, las células iban muriendo a medida que se le hacían pases. Por lo tanto se procedió la mejora de dicho medio, teniendo en cuenta varios factores:

- Mejorar la adherencia celular usando vitronectina como matriz.
- Favorecer la proliferación mediante la adición de Hidrocortizona al cultivo.
- Inhibir la senescencia replicativa reduciendo la concentración de glucosa en el medio de cultivo.

4.9.4 Mejora de la adherencia celular

Con el fin de mejorar la adherencia celular a lo largo del mantenimiento del cultivo se procedió al estudio del uso de vitronectina como matriz celular, en comparación con la gelatina porcina. Para ello se hizo un cultivo simultáneo midiéndose la proliferación celular a lo largo del tiempo, observándose que tanto al inicio como al final del cultivo, hay mucha más cantidad de células en el cultivo con **vitronectina** (rojo) que en el cultivo con gelatina (verde) (Figura 33).

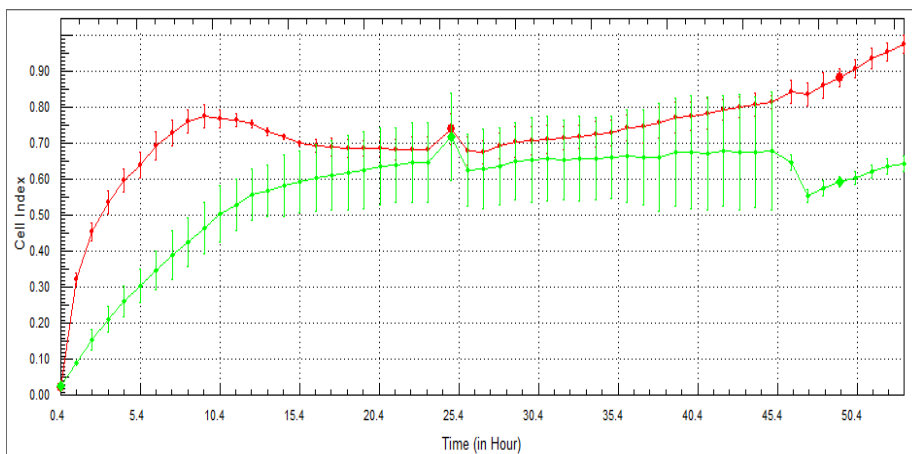


Figura 33: Análisis de la adherencia celular usando el equipo iCELLigence. Tasa de proliferación frente a número de horas en una población de 6000 células/cm². La curva roja representa la curva de proliferación de células cultivadas sobre Vitronectina. La curva verde representa la curva de proliferación de células cultivadas sobre gelatina. Se observa una mayor proliferación al final del cultivo en las células cultivadas con vitronectina.

4.9.5 Aumento de la proliferación celular.

En primer lugar tratamos de promover la proliferación para lo que decidimos añadir Hidrocortisona (HCOR) al cultivo, el cual se ha demostrado que es un factor de crecimiento que junto con una proteína matriz adecuada permite el aislamiento de CMM humanas en cultivos primarios y su posterior expansión. Para ello realizamos ensayos con distintas concentraciones de HCOR, en un cultivo con el Medio Químicamente Definido establecido (75% de bFGF + 2 μ M de DETA-NO), con el fin de comprobar si este factor de crecimiento junto con la vitronectina favorece la proliferación (Figura 34). Pudimos comprobar que con una concentración de **hidrocortisona de 100nM**, la proliferación celular aumenta casi el doble en el cultivo con vitronectina frente a gelatina. Con lo cual añadimos un factor más a nuestro medio de cultivo químicamente definido.

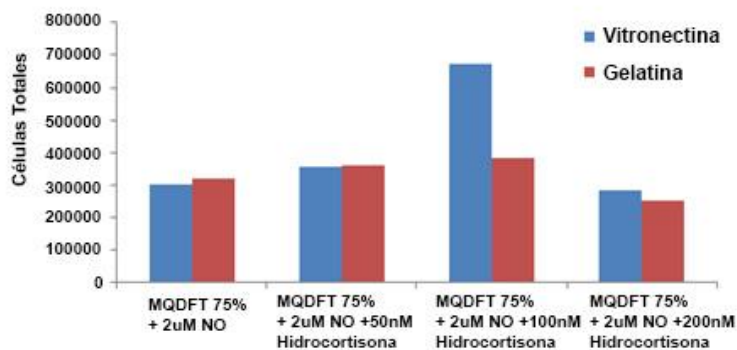


Figura 34: Análisis de la proliferación celular por conteo celular. Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 6000 células/cm². Tomamos como control la condición MQDFT 75% + 2 μ M NO. Se obtiene un mayor número de células totales en el cultivo sobre vitronectina (azul) con la adición de una concentración de 100nM de Hidrocortisona al medio MQDFT 75% + 2 μ M NO. MQDFT 75% 2 μ M (Medio Químicamente Definido + bFGF (75%) + TGF- β + 2 μ M NO).

4.9.6 Inhibición de la senescencia replicativa

Con el fin de inhibir la senescencia replicativa a lo largo de los pases procedimos a llevar a cabo el cultivo de CMM humanas sobre vitronectina con un medio de cultivo bajo en glucosa y compararlo con el establecido en los experimentos anteriores. Para ello realizamos cultivos paralelos con dos medios: el medio libre de suero con 75% de bFGF empleado hasta ahora, al que llamamos HG (Alto en Glucosa), y con un medio con la misma concentración de bFGF pero modificado con DMEM bajo en glucosa al que llamamos LG (Bajo en Glucosa). Se realizó un cultivo acumulativo a lo largo de 42 días, sobre placas cubiertas con vitronectina, partiendo de un cultivo de $15 \cdot 10^4$ células ($6000 \text{ células/cm}^2$), comparando los medios de cultivo químicamente definidos HG y LG. Se realizaron los pases cada siete días y en cada pase se tomaron fotografías para observar la morfología y densidad celular, y se realizó un conteo del número total de células mediante un ensayo por exclusión por Trypan para determinar la proliferación celular.

En el primer pase, a los 7 días de cultivo (Figura 35), pudimos observar que la morfología celular se mantenía en todas las condiciones, y que la densidad celular era alta, viéndose considerablemente incrementada en presencia de NO y HCOR. En el conteo celular se comprobó que el número total de células ascendía a más de $5 \cdot 10^5$ células con el medio LG y presencia de NO y HCOR.

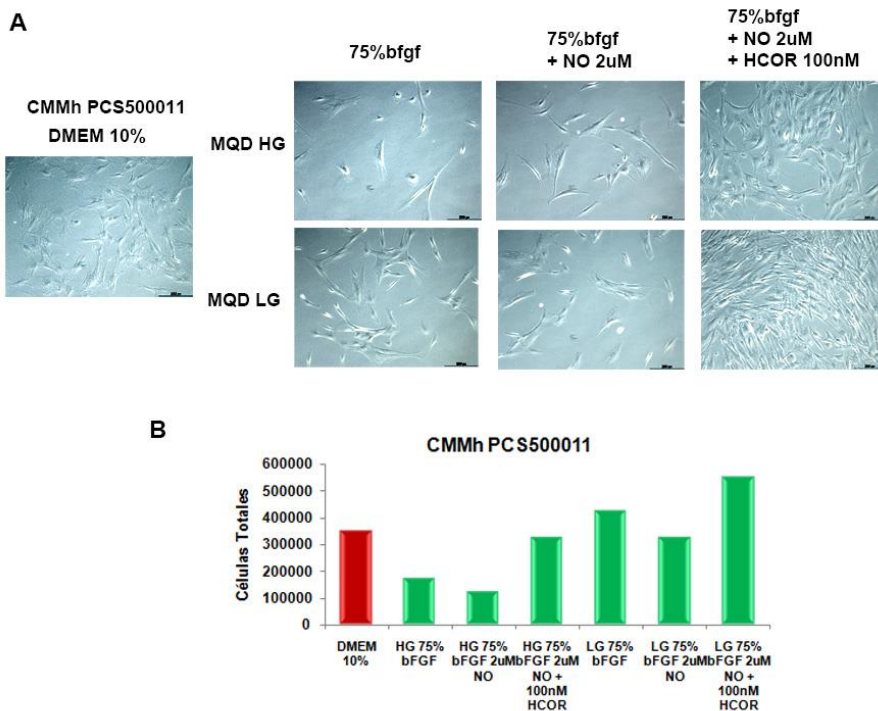


Figura 35. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 7 días de cultivo. **A)** Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo inicial de 6000 células/cm² en cada condición. Se observa una morfología similar al control en todas las condiciones, pero un considerable aumento de la densidad celular cuando se adiciona hidrocortisona. **B)** Análisis de la proliferación celular por conteo del número de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización en una población de 6000 células/cm² en cada condición. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 7 días de cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2μM NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

En el segundo pase, a los 14 días de cultivo (Figura 36), se observó que la morfología celular variaba y que la densidad celular descendía considerablemente en las condiciones en ausencia de NO y HCOR, tanto en medio HG, como LG, siendo con diferencia la condición con mayor densidad celular el medio LG en presencia de NO y HCOR. Estos resultados se confirmaron por conteo celular,

ascendiendo el número total de células de Tejido Adiposo cultivadas en dicho medio a más de $4 \cdot 10^6$ células. Sin embargo, en el resto de condiciones el número total de células se vio descendido con respecto al pase anterior.

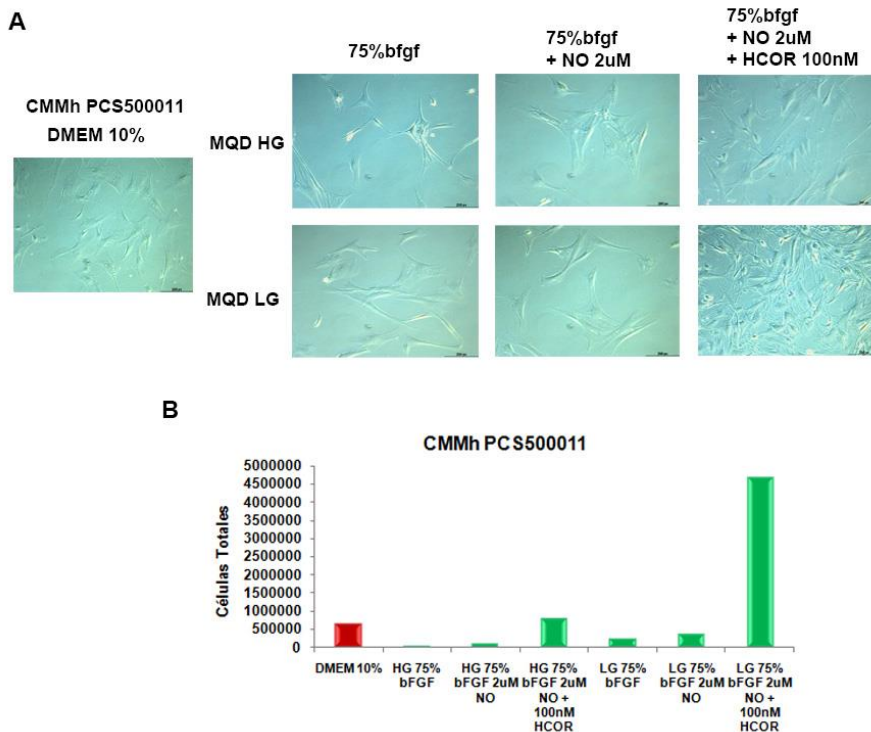


Figura 36. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 14 días de cultivo. A) Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo acumulativo. Se observa una morfología similar al control en todas las condiciones, pero un considerable aumento de la densidad celular en el cultivo con medio LG 75% bFGF + 2 μ M NO + 100nM HCOR. **B)** Análisis de la proliferación celular por conteo de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización de un cultivo acumulativo. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 14 días de cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2 μ M NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

En el tercer pase, a los 21 días de cultivo (Figura 37), pudimos comprobar que la densidad celular en los cultivos con medio HG disminuía considerablemente. Sin embargo, el número total de células en el cultivo con medio LG aumentaba significativamente, incluso más que en el medio control, tanto en ausencia como en presencia de NO y HCOR, siendo el aumento en presencia de los mismos mucho más sorprendente.

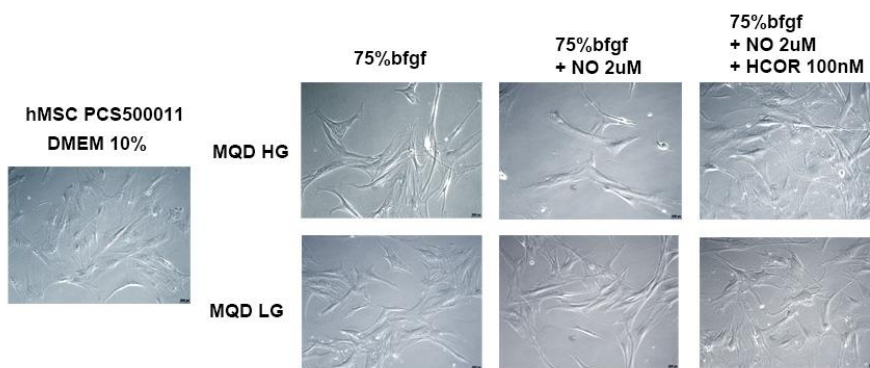


Figura 37. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 21 días de cultivo. Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo acumulativo. Se observa una morfología similar al control (DMEM 10%) en todas las condiciones, pero un aumento de la densidad celular en el cultivo con los medios HG y LG 75% bFGF + 2 μ M NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

En el cuarto pase, a los 28 días de cultivo (Figura 38), se visualizó una considerable disminución de la densidad celular en los cultivos con ambos medios con respecto al pase anterior, pero con el cultivo con el medio LG en presencia de NO y HCOR se sigue obteniendo un mayor número de células totales que con el resto.

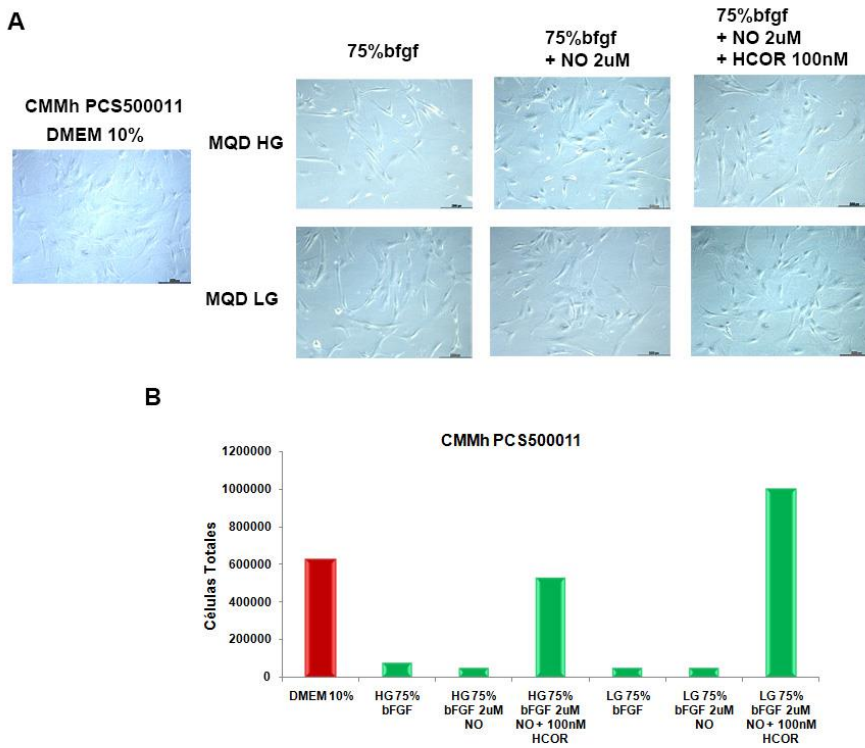


Figura 38. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 28 días de cultivo. **A)** Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo acumulativo. Se observa una morfología y densidad celular similar al control en todas las condiciones. **B)** Análisis de la proliferación celular por conteo del número de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización de un cultivo acumulativo. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 28 días de cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2 μ M NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

A los 42 días de cultivo (Figura 39), se volvió a detectar un considerable descenso de la densidad celular en los cultivos con medio HG con respecto al control; mientras que el número total de células mesenquimales de Tejido Adiposo en el cultivo con medio LG en presencia de NO y HCOR aumentaba significativamente.

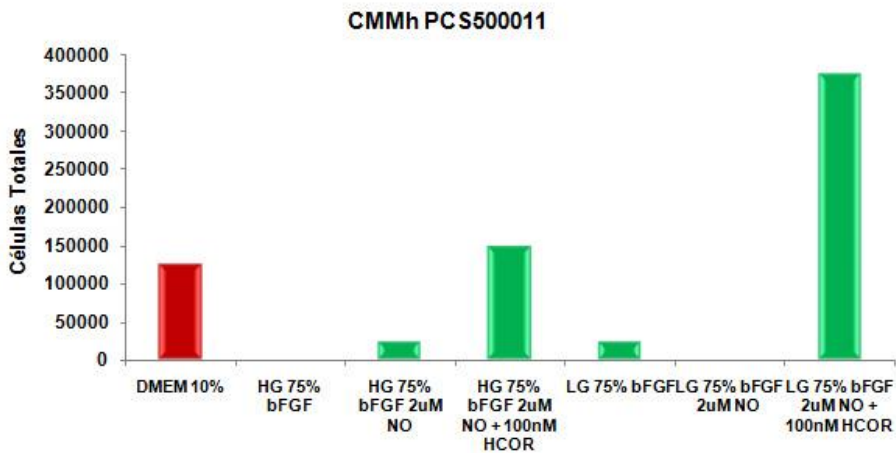


Figura 39. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 42 días de cultivo. Análisis de la proliferación celular por conteo del número de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización de un cultivo acumulativo. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 42 días de cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2 μ M NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidro cortisona), NO (Óxido Nítrico).

Con los resultados del conteo se hizo un análisis comparativo para visualizar el aumento de la densidad celular a lo largo de los pases, y como el cultivo con el medio LG en presencia de NO y HCOR favorece la expansión celular (Figura 40). La gráfica muestra una mayor proliferación con el medio LG en presencia de NO y HCOR con respecto al control y al resto de medios.

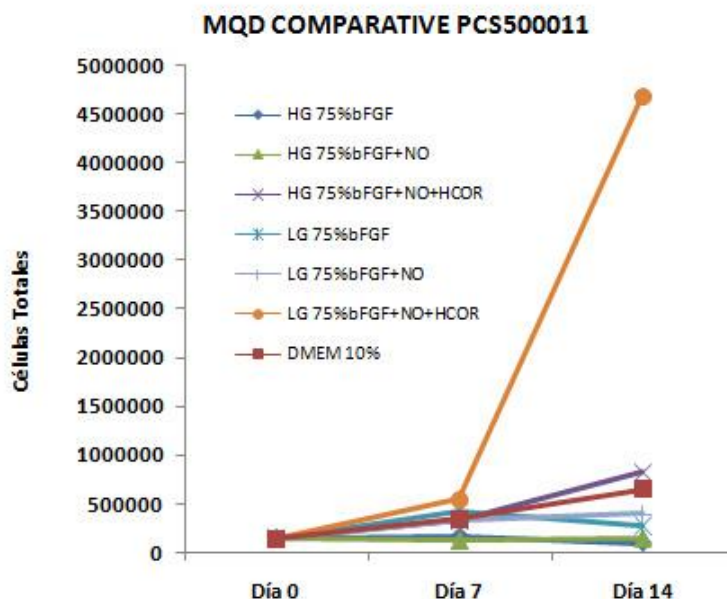


Figura 40. Análisis comparativo de la proliferación celular. Representa el número total de células contadas en cada pase celular a lo largo de 14 días en cultivos a partir de una población inicial de 6000 células/cm². Cada color representa una condición de medio de cultivo, indicada en la leyenda. Se observa una mayor proliferación celular a los 14 días en las células cultivadas con el medio LG 75% bFGF + 2μM NO + 100nM HCOR. HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

4.9.7 Validación del Medio Químicamente Definido

Para poder confirmar la viabilidad de dicho medio se estudió el mantenimiento de la proliferación celular mediante el análisis de la proteína Ki-67, comprobándose que las células cultivadas con el medio seleccionado presentaban una expresión de dicha proteína similar a las cultivadas con el medio control (Figura 41).

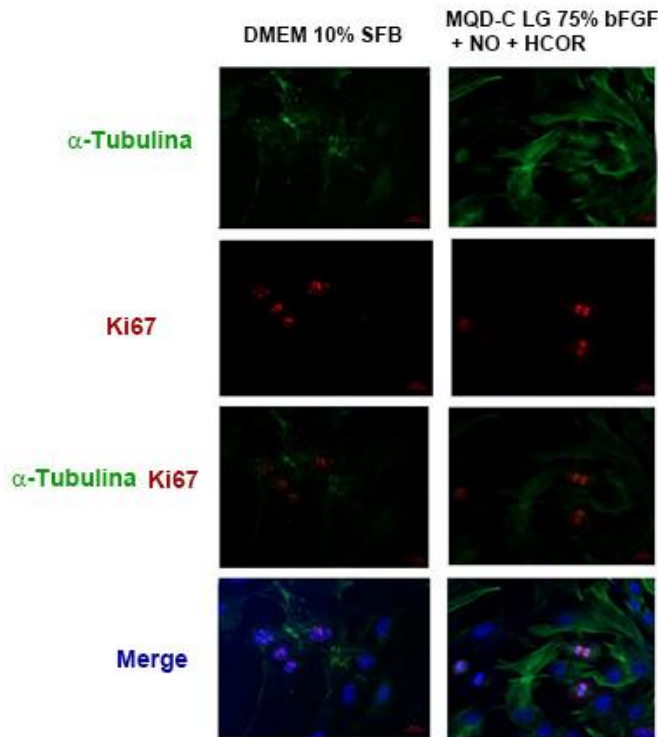


Figura 41. Análisis de la proliferación celular por estudio de Ki-67 mediante inmunofluorescencia. La expresión de Ki-67 fue analizada por un ensayo de inmunofluorescencia. Las imágenes muestran células cultivadas en el medio control (DMEM 10% SFB) y en el medio sin suero con bFGF reducido suplementado con NO y HCOR y posteriormente teñidas con DAPI (azul), Ki-67 (rojo) y α -TUBULINA (verde). Escala de 25 μ M. Las imágenes mostradas son las más representativas de tres experimentos. Se observa una expresión de Ki-67 similar en ambas condiciones. SFB (Suero Fetal Bovino), LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

Se estudió el mantenimiento de las características fenotípicas y de potencia de las células mesenquimales humanas para las condiciones indicadas en la imagen (Figura 42), observándose que el medio bajo en glucosa con adición de 2 μ M de NO y 100nM de HCOR presentaba un patrón más óptimo, con expresión en los marcadores

positivos (CD73 y CD90) y ausencia de expresión en los negativos (CD45, CD34 y CD14).

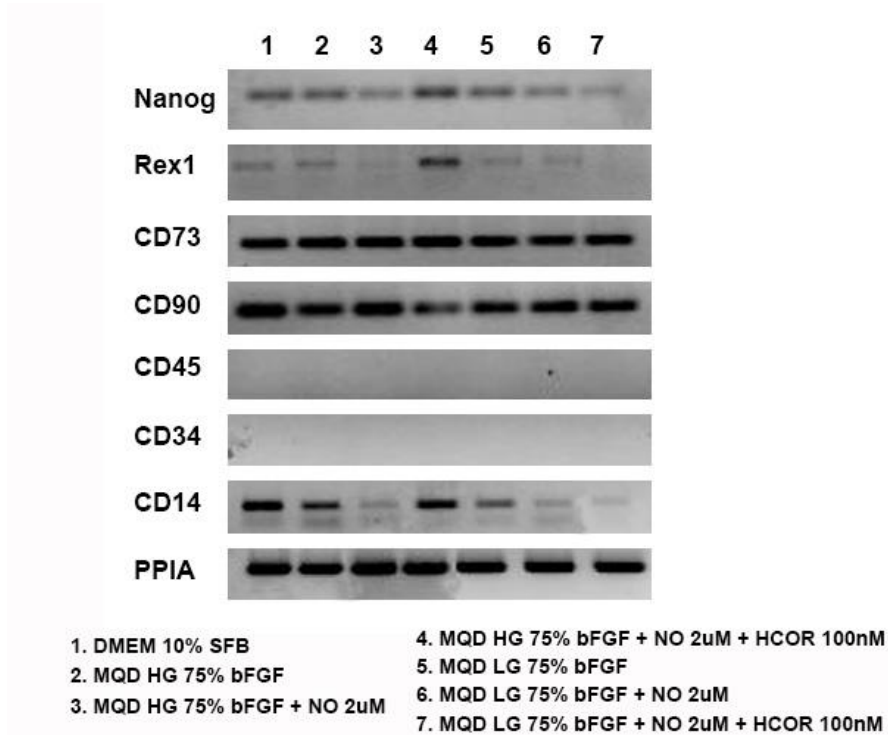


Figura 42. Análisis del fenotipo. Estudio de la expresión de genes de características fenotípicas de las células madre mesenquimales humanas por PCR cualitativa de una población inicial de 6000 células/cm². Se observa un patrón más óptimo para el medio LG 75% bFGF + 2μM NO + 100nM HCOR, donde hay expresión en los marcadores positivos (CD73 y CD90) y no hay expresión en los marcadores negativos (CD45, CD34 y CD14). El control aparece nombrado con el número 1. En la leyenda se indica la composición de los diferentes medios de cultivo. Esta imagen es la más representativa de tres experimentos independientes. Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la expresión del control endógeno PPIA. SFB (Suero Fetal Bovino), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa), LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

4.10 Cultivo de la línea de Células Madre Mesenquimales humanas de Médula Ósea (PCS 500-012) con el Medio Químicamente definido

Con el fin de corroborar la eficiencia de este medio en una línea celular adicional, se procedió a desarrollar el proceso experimental llevado a cabo en el punto anterior en células madre mesenquimales de médula ósea (PCS 500-012).

A los 7 días de cultivo (Figura 43), se observó que la morfología celular se mantenía en todas las condiciones, y que la densidad celular era alta, viéndose ya más incrementada en el medio bajo en glucosa y presencia de NO y HCOR. Adicionalmente, en el conteo celular se comprobó que el número total de células ascendía a $5 \cdot 10^5$ células totales con el medio “Bajo en Glucosa” y presencia de NO.

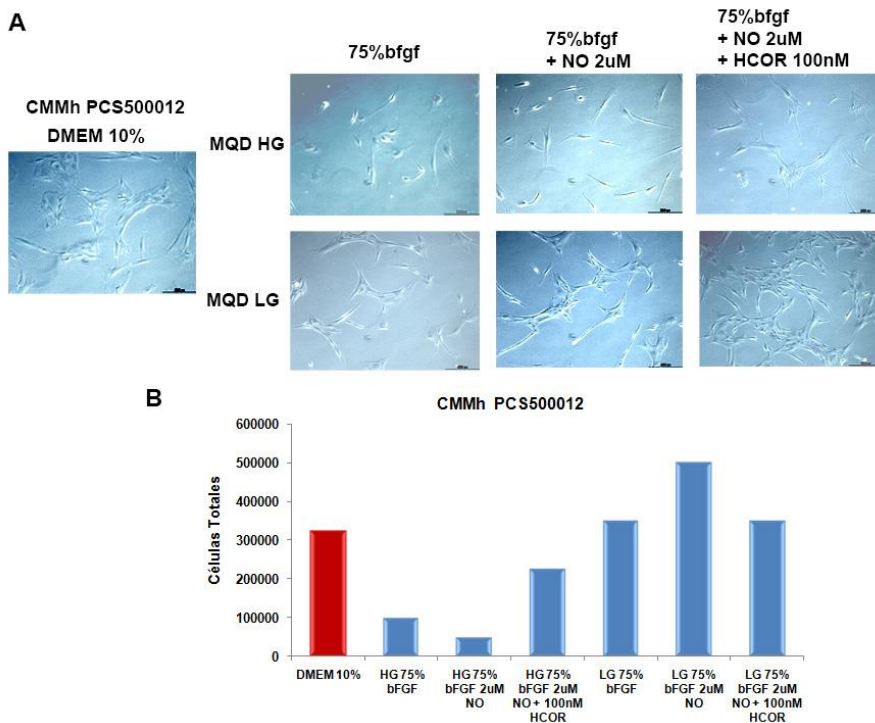


Figura 43. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 7 días de cultivo. A) Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo inicial de 6000 células/cm² en cada condición. Se observa una morfología similar al control en todas las condiciones, pero un considerable aumento de la densidad celular en el cultivo con medio LG 75% bFGF + 2μM NO + 100nM HCOR. **B)** Análisis de la proliferación celular por conteo de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización de un cultivo inicial de 6000 células/cm² en cada condición. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 14 días de cultivo en las células cultivadas con medio LG. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

A los 14 días de cultivo (Figura 44), se observó que la morfología celular variaba y que la densidad celular descendía considerablemente en las condiciones en ausencia de NO y HCOR, tanto en medio HG, como LG, siendo con diferencia la condición con mayor densidad celular el medio LG en presencia de NO y HCOR.

Estos resultados se confirmaron por conteo celular, ascendiendo el número total de células de médula ósea cultivadas con medio LG en presencia de NO y HCOR a más de un millón de células. Sin embargo, en el resto de condiciones el número total de células se vio descendido con respecto al pase anterior.

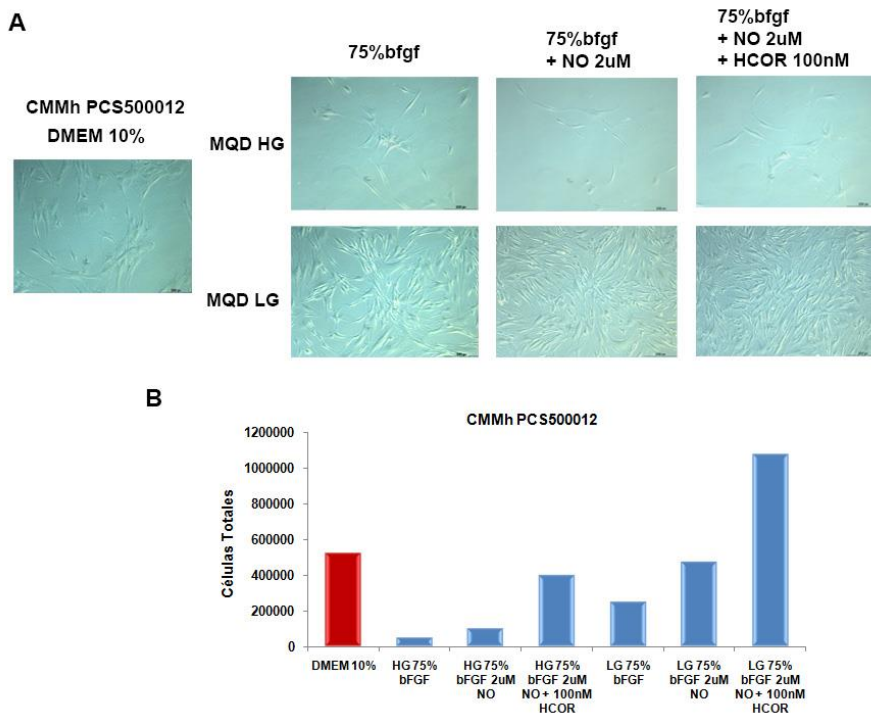


Figura 44. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 14 días de cultivo. A) Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo acumulativo. Se observa una morfología similar al control en todas las condiciones, pero un considerable aumento de la densidad celular en los cultivos con medio LG. B) Análisis de la proliferación celular por conteo de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización de un cultivo acumulativo. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 14 días de cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2μM NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidro cortisona), NO (Óxido Nítrico).

A los 21 días de cultivo (Figura 45), pudimos visualizar que la densidad celular en los cultivos con medio HG disminuía considerablemente; mientras que con medio LG aumentaba significativamente, incluso más que en el medio control, tanto en ausencia como en presencia de NO y HCOR, siendo el aumento en presencia de los mismos mucho más sorprendente.

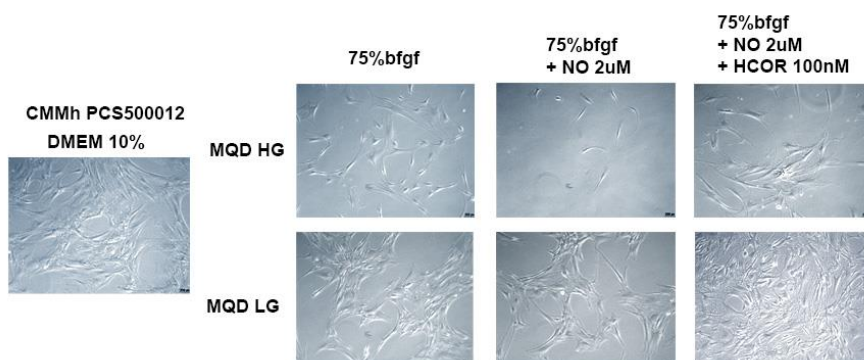


Figura 45. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 21 días de cultivo. Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo acumulativo. Se observa una morfología similar al control (DMEM 10%) en todas las condiciones, pero un considerable aumento de la densidad celular en el cultivo con medio LG 75% bFGF + 2 μ M NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

A los 28 días de cultivo (Figura 46), volvimos a observar un descenso en la densidad celular en los cultivos con medio HG y un ascenso en el medio LG con respecto al control. Este resultado fue verificado mediante el conteo celular, donde observamos un incremento significativo del número total de células cultivadas en medio LG con respecto al control, siendo mucho más considerable, en presencia de NO y HCOR, más de un millón de células.

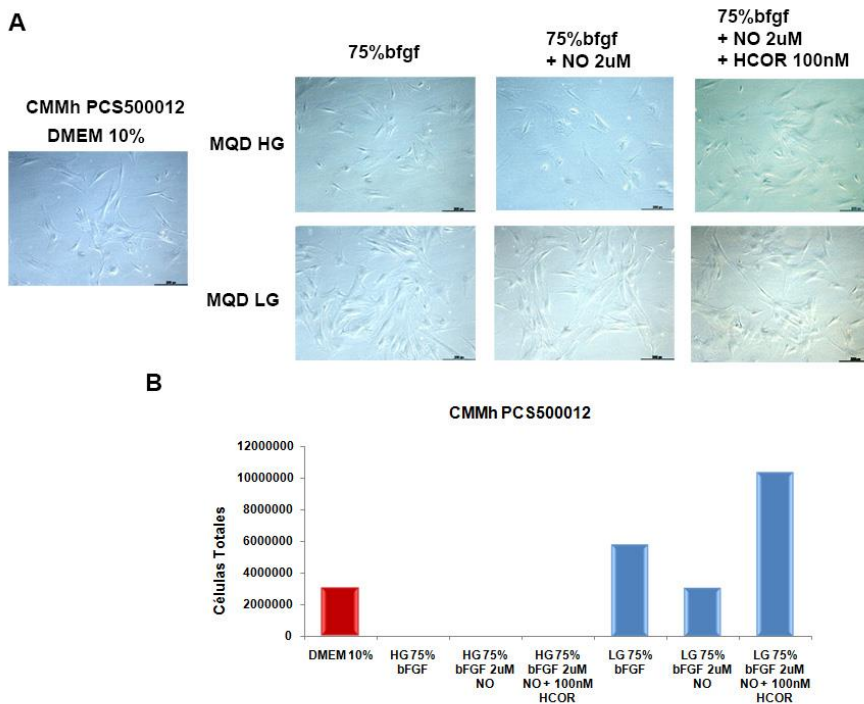


Figura 46. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 28 días de cultivo. A) Análisis de la morfología y densidad celular por toma de fotos de un cultivo acumulativo. Se observa una morfología similar al control en todas las condiciones, pero un considerable aumento de la densidad celular en los cultivos con medio LG. **B)** Análisis de la proliferación celular por conteo de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización de un cultivo acumulativo. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 28 días de cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2µM NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

A los 42 días de cultivo (Figura 47), se determinó mediante conteo que las células CMM humanas de médula ósea presentaron una disminución en el número total de células en todas las condiciones, excepto aquellas cultivadas con medio LG en presencia de NO y HCOR, en las cuales se observó un aumento de hasta más de un

millón y medio de células., siendo muy superior al número total de células cuantificadas en el medio control.

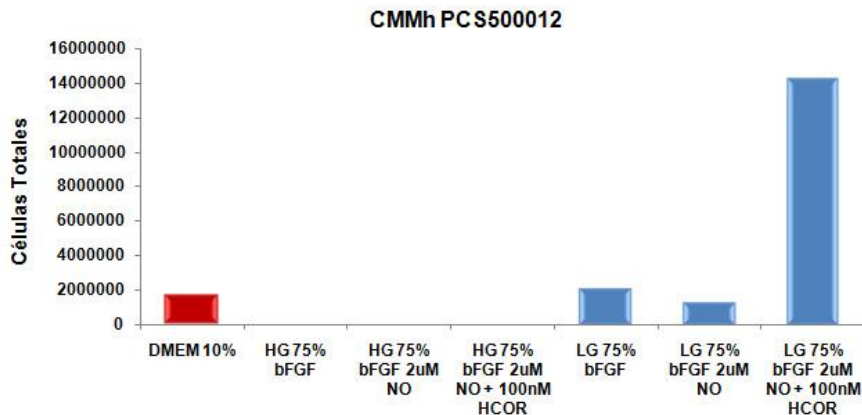


Figura 47. Estudio del medio químicamente definido bajo en glucosa (LG) a los 42 días de cultivo. Análisis de la proliferación celular por conteo de células totales. Proliferación celular frente a condiciones de optimización de un cultivo acumulativo. El control (DMEM 10% SFB) aparece representado de color rojo. Se obtiene un mayor número de células totales a los 42 días de cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2μM NO + 100nM HCOR. CMMh (Células Madre Mesenquimales humanas), MQD (Medio químicamente definido) HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

Finalmente, al igual que con las células de tejido adiposo, se hizo un análisis comparativo de todos los medios con los resultados obtenidos del conteo celular, con el fin de visualizar como el medio bajo en glucosa en presencia de NO y HCOR favorece la expansión celular aumentando la densidad celular en cada pase (Figura48). En este análisis pudimos observar como el medio LG en presencia de NO y HCOR aumenta el número total de células hasta los 42 días de cultivo, mientras que con el resto de los medios la proliferación comienza a disminuir a partir del día 28.

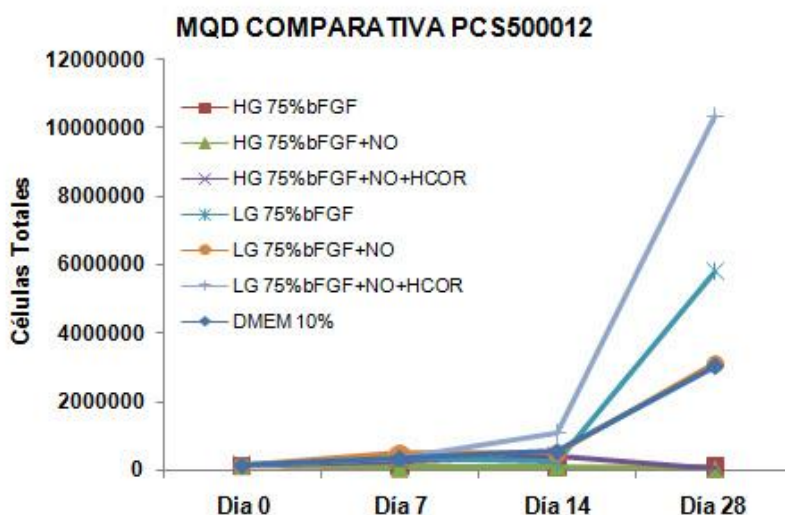


Figura 48. Análisis comparativo de la proliferación celular. Representa el número total de células contadas en cada pase celular a lo largo de 28 días en cultivos a partir de una población inicial de 6000 células/cm². Cada color representa una condición de medio de cultivo, indicada en la leyenda. Se observa una mayor proliferación celular a los 28 días en las células cultivadas con el medio LG 75% bFGF + 2μM NO + 100nM HCOR. HG (alto en glucosa) LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

4.10.1 Validación del Medio Químicamente Definido

Como hemos comprobado en el caso de las células CMM humana de médula ósea el medio con mayor proliferación celular también fue el Medio Químicamente Definido LG en presencia de NO y HCOR. Para poder confirmar la viabilidad de las células cultivadas en dicho medio se estudió el mantenimiento de la proliferación celular mediante el análisis de la proteína Ki-67, comprobándose que las células cultivadas con el medio seleccionado presentaban una expresión de dicha proteína similar a las cultivadas con el medio control (Figura 49).

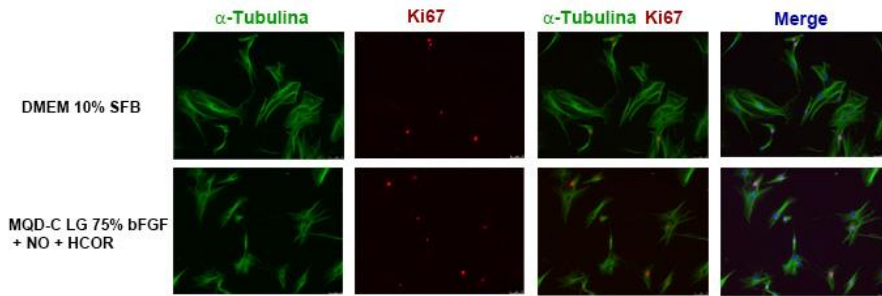


Figura 49. Análisis de la proliferación celular por estudio de Ki-67 mediante inmunofluorescencia. La expresión de Ki-67 fue analizada por un ensayo de inmunofluorescencia. Las imágenes muestran células cultivadas en el medio control (DMEM 10% SFB) y en el medio sin suero y bFGF reducido suplementado con NO y HCOR, y posteriormente teñidas con DAPI (azul), Ki-67 (rojo) y α -TUBULINA (verde). Escala de 25 μ M. Las imágenes mostradas son las más representativas de tres experimentos. Se observa una expresión de Ki-67 similar en ambas condiciones. SFB (Suero Fetal Bovino), MQD-C (Medio químicamente definido-CABIMER), LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

En el caso de las características fenotípicas y de potencia, pudimos comprobar mediante una PCR cualitativa que las células cultivadas en dicho medio mantenían la pluripotencia (expresión de Nanog y Oct4), expresaban marcadores de superficie de células madre mesenquimales (Nestina e Integrina), así como expresión de los marcadores positivos CD105, CD90 y CD73 (Figura 50).



Figura 50. Análisis de características fenotípicas del medio MQD LG 75% bFGF + 2 μ M NO + 100nM HCOR. Estudio de la expresión de genes de características fenotípicas y marcadores de pluripotencia y superficie de las células madre mesenquimales humanas por PCR cualitativa. Se observa una expresión positiva en todos los genes estudiados. Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la expresión del control endógeno PPIA.

Además, mediante citometría de flujo se comprobó que las células cultivadas con el medio químicamente definido presentaban un patrón fenotípico muy similar al control, siendo incluso la expresión de los marcadores negativos menor (Figura 51).

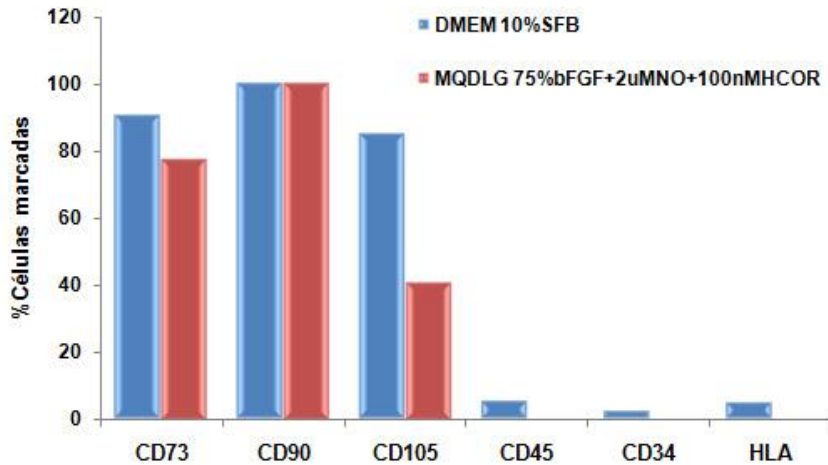


Figura 51. Análisis del fenotipado por Citometría de flujo. Porcentaje total de células que expresan cada anticuerpo en una población de 5000 células/cm². El control aparece nombrado como “DMEM10%” (azul). Se observa que el medio LG 75% bFGF + 2 μM NO + 100 nM HCOR presenta un patrón fenotípico similar al control. SFB (Suero Fetal Bovino), MQD (Medio químicamente definido), LG (bajo en glucosa), HCOR (Hidrocortisona), NO (Óxido Nítrico).

4.11 Adherencia de las células madre mesenquimales humanas de tejido adiposo a “microcarriers”

Actualmente, las células madre mesenquimales han supuesto un gran progreso en múltiples ensayos clínicos, pero el requerimiento de altas dosis celulares es imposible de obtener con los métodos de cultivo tradicionales en 2D. Debido a esta demanda de futuras terapias celulares, el uso de “microcarriers” para generar células madre en ensayos 3D está adquiriendo un gran interés.

4.11.1 Cultivo en “SpinnerFlasks”

Hemos realizado ensayos de cultivo de células Mesenquimales de Tejido Adiposo en “SpinnersFlasks” mediante el uso de “microcarriers” (Hilex II Microcarriers, SoloHill Engineering) (Figura 52). Las condiciones establecidas fueron nuestro Medio Químicamente Definido con 75%bfgf y 2 μ M DETA-NO, y como control el medio de cultivo óptimo para mesenquimales con 10% de suero.



Figura 52. “Spinnerflasks” con medio control y medio químicamente definido en agitación en un incubador a 37°C y 5% CO₂.

Para controlar que el pH del medio se mantenía estable y que por tanto no había muerte celular, tomamos muestras de cada condición todos los días y medimos el pH en un peachímetro, comprobando que efectivamente el pH del medio se mantenía en unos valores neutros, como se puede ver en la tabla 7.

Tabla 7. Mediciones del pH del medio de cultivo a lo largo de 7 días mediante un peachímetro.

pH/día	1	2	3	4	5	6	7
Control	7,68	7,77	7,77	7,86	7,70	7,77	7,93
MQD 75%	7,72	7,68	7,77	7,81	7,76	7,82	7,97

El siguiente paso fue visualizar la adherencia celular a los “microcarriers”, para lo que tomamos muestras de ambas condiciones y teñimos los núcleos con DAPI (Figura 53). Tomamos fotos al microscopio de fluorescencia, donde pudimos observar que en el medio químicamente definido había una mayor cantidad de núcleos que en el medio control, lo que significa que el cultivo está funcionando y que las células se están adhiriendo a los “microcarriers”, siendo posible que esta adherencia esté siendo favorecida por la presencia de NO. Sin embargo, todavía es necesario optimizar el procedimiento de cultivo.

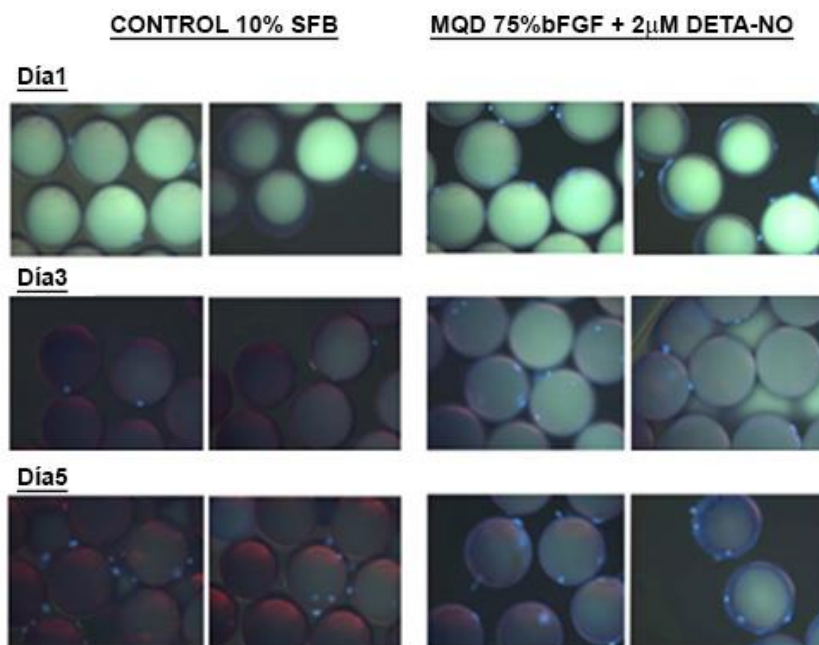


Figura 53. Estudio de la adherencia celular. Tinción de los núcleos con DAPI y visualización al microscopio de las células cultivadas en “microcarriers” mediante “spinnerflasks” en el medio control 10% de SFB y el medio químicamente definido. Ensayo realizado a los 1, 3 y 5 días. Se observa un mayor número de células teñidas con DAPI en el cultivo con el medio LG 75% bFGF + 2µM NO + 100nM HCOR. SFB (Suero Fetal Bovino), MQD (Medio químicamente definido), DETA-NO (Óxido Nítrico).

Además se realizó este mismo ensayo con células Mesenquimales de Tejido Adiposo, estableciendo como condiciones la condición control con 10% de suero, y la condición 5% de suero + 5µM DETA-NO. Sin embargo, en este caso, para mejorar la visualización de las células adheridas incubamos las células con anti-tubulina y teñimos con DAPI, para ver el citoesqueleto y el núcleo (Figura 54). Tomamos fotos al microscopio de fluorescencia, donde volvimos a corroborar que en la condición con presencia de DETA-NO existe una mayor adherencia de las células a los “microcarriers”

en comparación con la condición control óptima para el cultivo de células mesenquimales. Por lo tanto podemos confirmar que el NO a bajas concentraciones está promoviendo la adherencia celular a los “microcarriers” y por tanto favoreciendo el crecimiento de las mismas en un cultivo a gran escala.

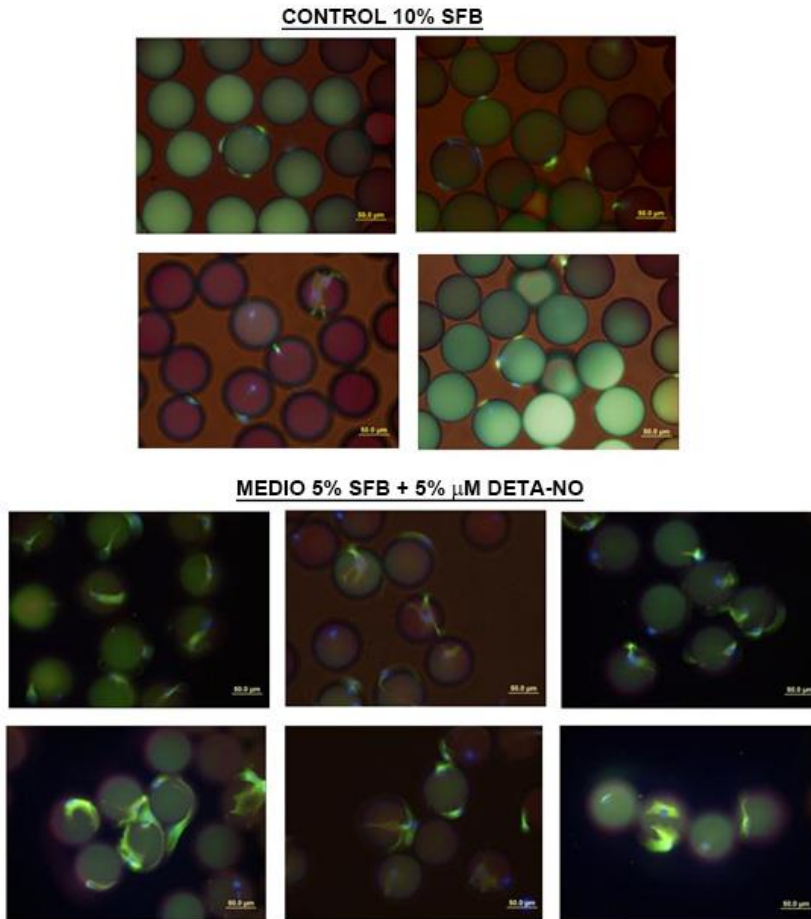


Figura 54. Estudio de la adherencia celular. Tinción del citoesqueleto con anti-tubulina y los núcleos con DAPI y visualización al microscopio de las células cultivadas en “microcarriers” mediante “spinnerflasks” en el medio control 10% de SFB y el medio con 5% de SFB y 5 μ M de DETA-NO. Fotos tomadas a los 5 días de cultivo. Se observa un mayor número de células teñidas con DAPI y marcadas con anti-tubulina en el medio con 5% de SFB y 5 μ M NO. SFB (Suero Fetal Bovino), DETA-NO (Óxido Nítrico).

4.11.2 Cultivo en Biorreactores

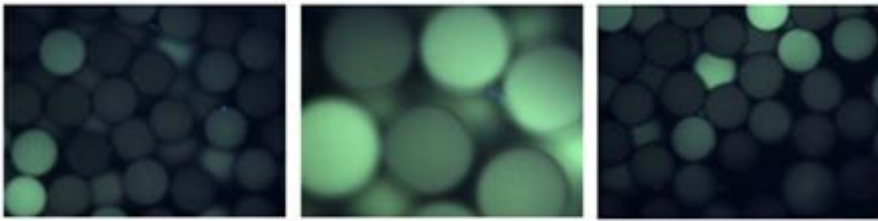
De forma paralela hemos llevado a cabo un cultivo de células mesenquimales humanas de Tejido Adiposo en Biorreactores (AplikonBiotechnology) con medio 10% SFB como control y medio MQD 75% bFGF + 2 μ M de DETA-NO como condición de estudio, para lo cual hemos seguido el mismo protocolo descrito anteriormente para los spinnerflasks. Sin embargo, a lo largo del proceso nos hemos encontrado con una serie de inconvenientes detallados a continuación:

- El número de células que obtuvimos tras el pase no fue suficiente para sembrar 6500 células/cm², con lo cual partimos de un menor número de células.
- No fue posible programar el biorreactor de la forma deseada: 4 horas a 50rpm, seguidas de 12 horas a 50 rpm en un proceso intermitente (3 min ON/30 min OFF). Tuvimos que dejar el biorreactor en agitación constante.
- A una agitación de 50 rpm no se conseguían levantar los beads, dada la estructura de las palas del biorreactor, con lo que tuvimos que aumentarla hasta 150 rpm.
- El pH del medio aumenta muchísimo llegando incluso hasta 9, siendo imposible regularlo, ya que el incubador no posee una bomba de CO₂. Ello es un gran inconveniente para el crecimiento celular.

Al quinto día de cultivo tomamos una muestra y visualizamos los “microcarriers” al microscopio de fluorescencia tras teñir los núcleos de las células con DAPI (Figura 55). Pudimos observar en las

imágenes que algunas células se habían adherido a los “microcarriers”, pero que la cantidad era muy baja, posiblemente debido a todos los inconvenientes mencionados arriba.

CONTROL 10% SFB



MQD 75%bFGF + 2 μ M NO



Figura 55. Estudio de la adherencia celular. Tinción de los núcleos con DAPI y visualización al microscopio de las células cultivadas en “microcarriers” mediante el uso de biorreactores, en el medio control 10% de SFB y el medio químicamente definido. Fotos tomadas a los 5 días de cultivo. Se observan pocas células marcadas con DAPI. SFB (Suero Fetal Bovino), MQD (Medio químicamente definido), NO (Óxido Nítrico).

5. Discusión

Regulación de la expresión del gen *Zic1* por altas concentraciones de Óxido Nítrico

El nombre de “Zic” proviene de dedos de zinc en el cerebelo, reflejando la expresión celular de los genes *Zic* en ratones adultos ¹¹⁷. Se ha reportado que el gen *Zic1* es crucial en numerosos programas del desarrollo, incluyendo sistema nervioso central, desarrollo muscular y esquelético y establecimiento de la asimetría izquierda-derecha en el embrión temprano ¹¹⁸. Específicamente, *Zic1*, un factor de transcripción dedo de zinc altamente conservado, presenta un papel temprano en el establecimiento de las diferentes regiones del futuro sistema nervioso ¹¹⁹. Estudios en diferentes organismos sugieren que *Zic1* está implicado en la formación de la cresta neural y el desarrollo cerebelar ¹¹⁹⁻¹²⁴. Además, *Zic1* se expresa en tejidos derivados de mesoderma, más prominentemente en somitas ^{121,125-127} y regula genes relacionados con el desarrollo de endoderma ⁹². Sin embargo, en esta tesis hemos demostrado que *Zic1* también se expresa en tejidos de endoderma, específicamente presenta una alta expresión en tejido pancreático de ratón y células pancreáticas adultas (MIN6). Además, hemos comprobado que *Zic1* co-expresa con *Pdx1*, un marcador de diferenciación temprana hacia endoderma, sugiriendo que puede estar involucrado en procesos de diferenciación hacia endoderma.

Estudios realizados previamente sugieren que el NO está implicado en la regulación de la diferenciación celular y morfogénesis de tejido. Concretamente, en estudios llevados a cabo por Mora *et al.* en 2010 se ha comprobado que altas concentraciones de DETA-NO

reprimen genes de pluripotencia, como Oct4 y Nanog, e inducen eventos de diferenciación temprana y la expresión de marcadores de endodermo definitivo, Pdx1⁸⁰. En esta tesis hemos comprobado que el tratamiento con altas concentraciones de NO en CME de ratón también induce la expresión del gen de ectodermo Zic1. Los ensayos de PCR, Western-Blot e inmunofluorescencia muestran que la expresión de Zic1 se incrementa tras la exposición a NO, condición en la que se observa una co-expresión de Zic1 y Pdx1 en las células. Con estos resultados hemos determinado que un gen propiamente de ectodermo se diferencia en etapas de diferenciación hacia endodermo, y lo hace con un comportamiento similar a Pdx1, lo que hace interesante su estudio.

Tras los resultados anteriores hemos profundizado un poco en la regulación de este gen por el NO. Decidimos estudiar el papel del factor de transcripción Egr1 sobre Zic1, ya que en estudios previos comprobamos que no presenta cambios en su expresión por el NO y que regula a Pdx1 bajo este tratamiento. Un factor de transcripción puede actuar como activador o represor en un mismo o diferentes genes. Es el caso de Egr1, el cual se ha descrito que actúa como represor en células de melanoma y como activador en células de cáncer de pecho, colon y próstata¹²⁸. También se ha comprobado que Egr1 puede actuar de forma diferente en el mismo gen, dependiendo de sus modificaciones postraduccionales, como es el caso del gen p300, el cual es reprimido por Egr1 cuando está acetilado y activado por el mismo cuando está fosforilado¹²⁹. Los ensayos de Chip mostrados en esta tesis revelan que Egr1 presenta un papel activador

sobre el gen *Zic1* en CME de ratón cuando se exponen a un tratamiento con altas dosis de NO. Los ensayos de pérdida y ganancia de función de *Egr1* confirman este resultado, indicando que el NO podría estar regulando la expresión de este gen a través del factor de transcripción *Egr1*.

Por otro lado, los eventos claves en el proceso del desarrollo son regulados por una de las principales vías de señalización, llamada Sonic hedgehog (*Shh*)¹³⁰. Se ha descrito que la activación de esta vía induce la transformación de células madre de tejido pancreático en células madre cancerígenas de páncreas, donde el factor de transcripción *Gli* actúa como mediador de señales ambientales y en la progresión de células madre pancreáticas cancerígenas en tumores metastáticos¹³¹. Las proteínas dedo de zinc *Gli* son factores de transcripción que regulan eventos en el desarrollo de vertebrados, y ha sido descrito que actúan como reguladores transcripcionales de la vía de señalización *Shh*¹³². Se han identificado numerosas dianas *Gli*, incluyendo reguladores de la determinación celular, proliferación y muerte, además de renovación y diferenciación de células madre¹³³. Ghabbari *et al.* demostraron en 2013 que la inhibición de la vía *Shh* induce la diferenciación de CME hacia endodermo definitivo, con una significativa disminución en la expresión de los genes *Oct4*, *Nanog*, *Shh*, *GATA4* y *Brachyury*, y un incremento en *TAT* y *Pdx1*¹³⁴. Por tanto decidimos estudiar el efecto del protocolo diferenciación hacia endodermo optimizado en nuestro laboratorio basado en altas concentraciones de NO en la regulación de la vía *Shh*. Los resultados obtenidos mediante ensayos de PCR y Western-Blot han mostrado una

disminución en la expresión de los genes diana de Shh, Gli1, Gli2, Patched y Nanog, determinando que el NO está suprimiendo esta vía a través de la disminución de la expresión de sus genes diana, inhibiendo de esta forma la proliferación y favoreciendo la diferenciación hacia endodermo.

Seguidamente nos planteamos determinar si estas modificaciones en la vía de Shh en el protocolo de diferenciación son promovidas por Zic1, por lo que buscamos si existe relación descrita entre este gen y la vía Shh y proliferación. Estudios recientes han mostrado evidencias de que Zic1 está involucrado en la progresión de numerosos tumores, tales como meduloblastoma, endometrial, neoplasma mesenquimal, y liposarcoma ¹³⁵⁻¹³⁷. Parece que Zic1 está altamente expresado en determinados tipos de cáncer, y funciona como un supresor de tumores mediante la inhibición de la proliferación celular en células de cáncer gástrico y cáncer colorectal ^{96,138-141}. Se ha descrito que las familias de proteínas Zic y Gli interaccionan física y funcionalmente a través de sus dominios zinc finger ^{95,132}. Se conoce que las proteínas Gli son intermediarias de la vía de señalización Shh, y que como un importante factor de transcripción, Zic1 es esencial para la regulación de las vías de señalización Shh y Notch en el desarrollo neural ^{95,96}. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de cómo Zic1 regula vías de señalización y su relación con los genes diana en tejidos endodérmicos. Es en este punto donde decidimos centrar nuestro estudio y comprobar si la modificación de la vía Shh por el NO en CMER es promovida por Zic1. Para ello hemos realizado un ensayo de sobreexpresión de Zic1

en condiciones de no diferenciación, mostrando que la expresión de los genes diana de la vía Shh disminuía levemente, mientras que la expresión de Pdx1 no cambia. Para confirmar este resultado planteamos un experimento futuro basado en el silenciamiento de Zic1 en presencia de DETA-NO, y comprobar si hay un incremento en la expresión de los genes Nanog, Patched, Gli1 y Gli2; y una disminución en la expresión de genes de diferenciación hacia endodermo como Pdx1. Con esto demostraríamos el papel de Zic1 en la regulación de esta vía. Además, procedimos a estudiar este papel de Zic1 en islotes de ratón, estudiando la expresión de Zic1 y los genes diana de dicha vía mediante ensayos de PCR. Los resultados mostraron que Zic1 presenta una alta expresión, mientras que los genes diana de la vía Shh reducen su expresión con respecto a la condición de no diferenciación en CME de ratón. Estos resultados pueden confirmar nuestra hipótesis propuesta para CME de ratón, indicando un posible papel de Zic1 en la inhibición de la vía de señalización Shh e inducción de la diferenciación. Igualmente, podríamos respaldar este resultado mediante el silenciamiento de Zic1 en islotes de ratón, y comprobar si se induce la expresión de los genes diana de la vía Shh y se promueve la diferenciación. Con esto podríamos confirmar el papel de Zic1 en la diferenciación hacia endodermo e inhibición de la proliferación.

Diseño y Optimización de un Medio de cultivo Químicamente Definido suplementado con bajas concentraciones de NO

Las propiedades de las células madre de diferenciarse en diversos tipos celulares especializadas y de autorrenovarse para producir más células madre y sus capacidades regenerativas únicas, hacen que presenten un gran potencial en terapias de medicina regenerativa, para el tratamiento de enfermedades como la diabetes o enfermedades cardíacas ^{1,8}. Las CME humanas presentan un gran potencial terapéutico, ya que presentan la capacidad de proporcionar una fuente de tejidos que podrían ser empleados en el reemplazamiento en enfermedades cuyas células nativas sean inactivadas o destruidas. Sin embargo, el uso de estas células está limitado por el gran inconveniente de que da lugar a la formación de tumores. Surge así un gran interés en el entendimiento de la biología de las CMMs para su potencial uso clínico. Estas células se presentan como una prometedora herramienta, gracias a su fácil aislamiento a partir de multitud de tejidos, y por presentar la capacidad de diferenciarse hacia tipos celulares de las tres capas germinales. Recientemente se han llevado a cabo significantes progresos con múltiples ensayo clínicos dirigidos a tratar una variedad de enfermedades humanas, como cáncer, diabetes, hueso, cartílago, corazón, gastrointestinal, inmune y enfermedades neurodegenerativas ^{15,28,29}. Sorprendentemente, se ha demostrado que las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, sangre y tejido de cordón umbilical, conducto pancreático y tejido adiposo muestran una gran capacidad para diferenciarse hacia células productoras de insulina,

proporcionando una vía para conseguir una futura cura para la diabetes tipo 1^{36,45}. Además, gracias a su capacidad de autorenovación y diferenciación, las CMMs ofrecen un importante papel en la regeneración de tejidos y medicina regenerativa para el tratamiento de úlceras de pie diabético, una significativa complicación de la diabetes que afecta altamente a la calidad de vida^{58,59}.

Actualmente, el uso de células madre en ensayos clínicos resulta muy prometedor. Sin embargo, el incrementado uso de ensayos clínicos basados en terapias celulares para tratar enfermedades supone la demanda de un alto número de dosis celulares. Por lo tanto para generar las altas dosis celulares necesarias se requieren grandes cantidades de medio de cultivo, los cuales contienen componentes animales como fuente de nutrientes, principalmente suero fetal bovino (SFB)^{98,100}. La producción de grandes volúmenes de medio presenta un alto coste de producción, además de necesitar más de un millón de fetos de vacas embarazadas anualmente. El aumento del uso de SFB y otros componentes animales presentes en el medio supone un gran incremento en el posible riesgo de transmisión de patógenos a pacientes^{20,101,102}. Por tanto, para conseguir esta alta demanda en la expansión celular se necesitan métodos eficientes, y que resuelvan los inconvenientes éticos, económicos, científicos y de protección animal que presentan los sistemas de cultivo basados en el uso de SFB y otros componentes animales. Surge así la necesidad de desarrollar medios químicamente definidos libre de componentes animales.

El desarrollo de medios químicamente definidos ha sido descrito en múltiples artículos. En 2010 Lucas *et al.* describieron un

medio de cultivo de CMM libre de suero que permitió la expansión de CMMs humanas indiferenciadas, con un fenotipo y perfil de expresión similar a las células expandidas en un medio con suero tradicional, además de mantener las definidas características de crecimiento y diferenciación de las CMMs ¹⁰⁷. Más tarde, se realizaron una serie de experimentos con un medio xeno-free optimizado para el cultivo de células mesenquimales aisladas de médula ósea y tejido adiposo, revelando un prometedor efecto en la proliferación y el mantenimiento de las principales propiedades funcionales y fenotípicas de las células testadas ¹⁴². Por otro lado, Ishikawa *et al.* llevaron a cabo un estudio comparativo con tres tipos de medios usados para expandir CMMs humanas, comparando la proliferación de las mismas. Los resultados revelaron una considerable mayor proliferación en el cultivo de CMMs humanas con STK2, el cual es un nuevo medio libre de suero desarrollado para la multiplicación de CMMs humanas ¹⁴³. Es crítico encontrar un medio de criopreservación efectivo y un protocolo optimizado para preservar CMM humanas para su uso clínico, que promueva la expansión y validación de las células, el transporte entre clínicas y crear copias de seguridad para repetidos trasplantes. Un crioprotector ideal no debería ser tóxico ni inmunogénico, para ambos, células y receptor, preservar la viabilidad y características celulares y ser químicamente inerte ^{144,145}. Shahla *et al.* reportaron la criopreservación de CMMs humanas de médula ósea y tejido adiposo en un medio libre de suero, probando que las células mantenían una alta viabilidad, expresión de marcadores de superficie y capacidad de diferenciarse hacia linajes mesodérmicos ¹⁴⁶. Skog *et al.* se propusieron crear un medio de diferenciación condrogénico libre de

suero para el cultivo de CMMs humanas de médula ósea. Compararon la efectividad de este medio con el medio de diferenciación condrogénica comercialmente disponible, y confirmaron que el medio de diferenciación “xenofree” era más eficiente que el medio condrogénico comercial ¹⁴⁷. Finalmente, Iwamoto *et al.* demostraron que la fibrosis del hígado era reducida por células de médula ósea cultivadas en un medio libre de suero, mejorando la función del hígado en ratones cirróticos¹⁴⁸.

En la presente tesis, nos proponemos optimizar el cultivo y expansión de células madre embrionarias humanas y de ratón, y principalmente de CMM usando un medio químicamente definido libre de suero, lo que ayudará a evitar cuestiones éticas y reducirá los costes de terapia, convirtiéndose la investigación de células madre en la escala clínica en una realidad.

Hemos diseñado una formulación basada en la suplementación con óxido nítrico. Nuestro grupo ha reportado que la exposición de CME a bajas concentraciones del donador de NO DETA-NO (diethylenetriamine NO adduct) previene la pérdida de expresión de genes de autorenovación, bloquea el proceso de diferenciación promovido por la ausencia LIF y bFGF y disminuye la expresión de marcadores de diferenciación como Brachyury, Gata6 and Gata4 ⁷⁹.

En primer lugar, hemos estudiado el efecto del Óxido Nítrico sobre células madre embrionarias de ratón, reduciendo la concentración de LIF, con el fin de mantener la pluripotencia y proliferación celular y abaratar los costes. Obtuvimos así un medio de cultivo óptimo para esta línea celular con una concentración de LIF de

un 25% suplementado con 2 μ M del donador de Óxido Nítrico DETA-NO. Igualmente, en CME humanas hemos comprobado que adicionando el donador de óxido nítrico DETA-NO a una concentración de 2 y 5 μ M es posible reducir la concentración de bFGF, componente crítico en el cultivo de células madre embrionarias humanas para el mantenimiento del estado indiferenciado de las mismas, al 75 u 87,5%, manteniendo la proliferación y pluripotencia de las células. Sin embargo, dado que uno de los mayores retos para el uso clínico de las células troncales es la exposición a productos derivados de animales no-definidos en el medio durante el cultivo y la expansión celular, conseguimos optimizar un medio libre de suero, con una concentración de bFGF de un 25% y en presencia de DETA-NO a una concentración de 2 μ M. Sin embargo, no es posible retirar por completo los factores de crecimiento en ausencia de suero, los cuales siguen suponiendo un alto coste en el medio de cultivo. Hemos comprobado que este medio mantiene la pluripotencia de las células madre embrionarias humanas, con el inconveniente de que se reduce la tasa de proliferación y supervivencia celular con respecto al medio control.

Posteriormente procedimos a optimizar un medio de cultivo químicamente definido libre de suero para el cultivo de CMM de tejido adiposo, estudiando el efecto del NO sobre las mismas. Ng *et al.* desarrollaron en 2008 un medio xeno-free basado en una serie de factores de crecimiento, entre ellos PDGF-BB, bFGF and TGF- β 1, los cuales se ha comprobado que promueven la expansión de CMMs humanas indiferenciadas ¹⁰⁵. En 2010 Jung *et al.* también reportaron un medio definido en el que los factores de crecimiento bFGF y TGF-

β eran críticos para la expansión de CMM humanas ¹⁴⁹. Teniendo en cuenta estos estudios y nuestros resultados obtenidos en los ensayos de pluripotencia, fenotipado y morfología, conseguimos estandarizar un medio químicamente definido libre de suero, el cual requiere de los factores de crecimiento bFGF, necesario para mantener el estado indiferenciado de las células madre humanas, y TGF- β , que regula la proliferación y diferenciación celular y la homeostasis de tejidos; además de otros componentes en el medio de cultivo que mejoren la adhesión, proliferación y fenotipo de las células madre mesenquimales, como son aminoácidos no esenciales, glutamina y piruvato. Así estudiamos el efecto del NO en este medio libre de suero, aprovechando su papel a bajas concentraciones en el mantenimiento de la pluripotencia y la supervivencia. Conseguimos reducir la concentración de bFGF a un 75%, y suplementándose con una concentración de DETA-NO de 2 μ M, obteniendo un medio libre de suero de menor coste, el cual mantiene la tasa de proliferación, características fenotípicas, morfología y capacidad de diferenciación.

Finalmente este medio fue optimizado realizando una serie de estudios hasta lograr que la proliferación y pluripotencia se mantuviesen a lo largo de los pases. Manton *et al.* descubrieron en 2013 que CME humanas podían ser propagadas y mantenidas en estado indiferenciado en condiciones libres de suero en un medio químicamente definido suplementado con vitronectina ¹⁵⁰. Otro estudio realizado por Heng *et al* en 2012 demuestra el uso de vitronectina como matriz para la propagación a largo plazo de CME humanas en un medio de cultivo definido ¹⁵¹. Recientemente se ha demostrado que CMPi cultivadas en condiciones libre de suero durante largo tiempo sobre vitronectina

recombinante mantenían la expresión de marcadores de pluripotencia, y capacidad de diferenciación hacia ectodermo, mesodermo y endodermo ¹⁵². Guokai *et al.* demostraron también el uso de vitronectina como matriz en el cultivo de CMPi y fibroblastos, favoreciendo su crecimiento ¹⁵³. Estos estudio entre otros indican que la vitronectina humana recombinante puede favorecer el cultivo y mantenimiento del estado de pluripotencia de células madre en condiciones no xenogénicas, y por tanto se procedió al estudio de la misma con nuestro medio químicamente definido. En primer lugar se comprobó que el cultivo sobre vitronectina favorecía la adherencia celular frente a la gelatina en las CMMs. Sin embargo, no era suficiente para mantener la proliferación y expansión de las mismas. La suplementación del medio con hormonas y componentes claves es también crucial. Ya en 1981 se demostró que la hidrocortisona incrementaba la proliferación de CMM de médula ósea humanas ¹⁵⁴. En 1995, Gronthos *et al.* comprobaron que un reactivo sintético de la hidrocortisona era un componente esencial en un medio libre de suero para el cultivo de células de médula ósea humanas ¹⁵⁵. Posteriormente, Jung *et al.* encontraron en 2010 que hidrocortisona, ácido ascórbico y fetuina eran importantes factores de crecimiento y anclaje junto con el uso de una proteína matriz adecuada, permitiendo el aislamiento de CMM humanas y su consiguiente expansión ¹⁴⁹. Dado el importante papel de la hormona hidrocortisona como un componente clave en un medio libre de suero para el crecimiento de CMM humanas decidimos confirmar la necesidad de esta hormona para aumentar la proliferación con nuestro medio y vitronectina como matriz. Concretamente obtuvimos resultados más óptimos con

hidrocortisona 100nM, aumentando la proliferación celular casi el doble en el cultivo con vitronectina. Finalmente se comprobó que para inhibir la senescencia replicativa y mantener el cultivo a lo largo de los pases fue necesario reducir la concentración de glucosa en el medio, empleándose un DMEM bajo en la misma. De esta forma se consiguió optimizar un medio de cultivo libre de suero para el cultivo de CMM humanas, tanto de tejido adiposo como de médula ósea, el cual mantiene las características fenotípicas de las mismas y aumenta la tasa de proliferación con respecto al medio control. Este medio titulado como “MQD-CABIMER” está constituido por un DMEM bajo en glucosa y los factores de crecimiento TGF- β y bFGF, este último a una concentración reducida al 75%, y suplementado con 2 μ M de NO y 100nM de HCOR, sobre vitronectina.

Recientemente, las células madre mesenquimales han adquirido un gran progreso en múltiples ensayos clínicos, pero el requerimiento de altas dosis celulares es en la mayoría de los casos imposible de obtener con los métodos de cultivo 2D tradicionales ¹¹¹. Debido a esta demanda para futuras terapias celulares, surge la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo óptimos capaces de lograr cantidades significativas de células madres, de forma segura, robusta y económica, de acuerdo con los requerimientos de calidad para productos médicos. De esta forma, el uso de biorreactores usando “microcarriers” como matriz se presenta como una prometedora alternativa.

El cultivo de células madre humanas mediante sistemas de cultivo en biorreactores ha sido objeto de estudio de una serie de ensayos, en células madre embrionarias ¹⁵⁶, y también en células madre mesenquimales ^{115,157}. Numerosos grupos han proporcionado datos preliminares del cultivo en “Spinners”, describiendo el uso de la transferencia celular “bead-to-bead” para pasar a gran escala ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. La expansión de CMMs humanas aisladas de tejido de placenta en “spinnerflasks” de 250 ml usando “microcarriers” fue descrita por Hewitt *et al.* estudiando el efecto de la geometría impulsora en la expansión celular, la densidad de cultivo y la concentración de microcarrier ¹⁵⁷. Por primera vez, CMMs humanas fueron cultivadas en un cultivo a gran escala basado en “microcarriers” usando un biorreactor de 5 litros, por el grupo de investigación del Doctor Hewitt. El protocolo establecido permitió el exitoso desprendimiento de las CMM humanas de la suspensión células-“microcarriers”, y la calidad fue posteriormente analizada, mostrando que las células mantenían sus marcadores inmunofenotípicos, características morfológicas principales y potencial de diferenciación multilínea ¹¹⁵. Recientemente, Goh *et al.* emplearon un biorreactor de 1 litro con pH y oxígeno disuelto controlados, para demostrar la escalabilidad de un cultivo de CMM fetales humanas, obteniendo 8×10^5 células/ml ¹⁶¹. Además, muy recientemente Thomas R.J *et al.* han demostrado por primera vez que las CMMs humanas de médula ósea pueden ser expandidas, levantadas, separadas, criopreservadas y recuperadas a partir de un proceso de cultivo potencialmente escalable en “microcarriers” y libre de suero, manteniendo sus características de

CMM, y proporcionando así un proceso de producción libre de suero escalable para terapias basadas en CMMs humanas ¹⁶².

Como parte final de esta tesis planteamos la posibilidad de escalar el cultivo de CMM con el medio químicamente definido libre de suero a gran escala mediante el uso de biorreactores, con la finalidad de generar las altas dosis celulares necesarias para propósitos terapéuticos, sin riesgos de infecciones e implicaciones éticas. Realizamos varios ensayos de cultivo de células Mesenquimales humanas de Tejido Adiposo en “SpinnersFlasks” mediante el uso de “microcarriers”, y pudimos confirmar que el NO a bajas concentraciones está promoviendo la adherencia celular a los “microcarriers” y por tanto favoreciendo el crecimiento de las mismas en un cultivo a gran escala.

6. Conclusiones

Con los resultados mostrados, podemos concluir que:

1. NO regula la expresión de Zic1 en CME de ratón, incrementando considerablemente su expresión.
2. Egr1 actúa como activador de la expresión de Zic1 tras el tratamiento con NO.
3. Mediante inmunofluorescencia se ha observado que Zic1 se expresa en células pancreáticas adultas, y que coexpresa con Pdx1 en dichas células, así como en CME de ratón tratadas con NO.
4. El tratamiento con NO modifica la vía de señalización de Shh, reduciendo la expresión de sus genes diana. Dicha modificación es promovida en parte por Zic1, ya que la sobreexpresión de éste induce una disminución en la expresión de estos genes
5. El cultivo de CME con bajas concentraciones de NO contribuye al mantenimiento del estado no diferenciado de las CMEs reemplazando a factores como el LIF o el bFGF.
6. Hemos optimizado un medio de cultivo químicamente definido para el cultivo de células madre embrionarias de ratón con una concentración de LIF reducida hasta un 75% y suplementándolo con 2 μ M del donador de Óxido Nítrico

DETA-NO. Dicho medio mantiene la morfología celular y favorece la proliferación celular a lo largo de los pases.

7. Hemos optimizado un medio de cultivo químicamente definido para el cultivo de células madre embrionarias humanas, el cual posee una concentración de bFGF reducida al 75, 87,5%, e incluso por completo y requiere la adición de DETA-NO a una concentración de 2 y 5 μ M. Dicho medio mantiene la morfología celular y favorece la proliferación celular a lo largo de los pases.
8. Hemos optimizado un medio de cultivo químicamente definido bajo en glucosa, libre de suero y con una concentración de bFGF reducida al 75% para el cultivo de células madre mesenquimales humanas, el cual requiere de vitronectina como proteína de adhesión celular, y de la adición de óxido nítrico e hidrocortisona en bajas concentraciones al medio de cultivo. Dicho medio mantiene la morfología celular y favorece la proliferación celular a lo largo de los pases.
9. El NO a bajas concentraciones en un cultivo de células madre mesenquimales con el medio establecido promueve la adherencia celular a los “microcarriers” y por tanto favorece el crecimiento de las mismas en un cultivo a gran escala.

7. Referencias

- 1 Alvarez, C. V. *et al.* Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *Journal of molecular endocrinology* **49**, R89-111, doi:10.1530/JME-12-0072 (2012).
- 2 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 3 Graf, T. & Stadtfeld, M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell stem cell* **3**, 480-483, doi:10.1016/j.stem.2008.10.007 (2008).
- 4 Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813, doi:10.1038/385810a0 (1997).
- 5 Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**, 1369-1373, doi:10.1126/science.1116447 (2005).
- 6 Young, R. A. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* **144**, 940-954, doi:10.1016/j.cell.2011.01.032 (2011).
- 7 Chambers, I. The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning and stem cells* **6**, 386-391, doi:10.1089/clo.2004.6.386 (2004).
- 8 Yamanaka, S. *et al.* Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell and tissue research* **331**, 5-22, doi:10.1007/s00441-007-0520-5 (2008).
- 9 Draper, J. S. & Andrews, P. W. Embryonic stem cells: advances toward potential therapeutic use. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **14**, 309-315 (2002).
- 10 Fridenshtein, A. [Osteogenic stem cells of the bone marrow]. *Ontogenez* **22**, 189-197 (1991).
- 11 Kuznetsov, S. A. *et al.* Circulating skeletal stem cells. *The Journal of cell biology* **153**, 1133-1140 (2001).
- 12 Rosada, C., Justesen, J., Melsvik, D., Ebbesen, P. & Kassem, M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcified tissue international* **72**, 135-142, doi:10.1007/s00223-002-2002-9 (2003).
- 13 De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. & Luyten, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism* **44**, 1928-1942, doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P (2001).
- 14 Miura, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* **100**, 5807-5812, doi:10.1073/pnas.0937635100 (2003).
- 15 Kassem, M., Kristiansen, M. & Abdallah, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **95**, 209-214, doi:10.1111/j.1742-7843.2004.pto950502.x (2004).
- 16 Luria, E. A., Panasyuk, A. F. & Friedenstein, A. Y. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* **11**, 345-349 (1971).
- 17 Rickard, D. J. *et al.* Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **11**, 312-324, doi:10.1002/jbmr.5650110305 (1996).
- 18 Reyes, M. *et al.* Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-2625 (2001).
- 19 Olmsted-Davis, E. A. *et al.* Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15877-15882, doi:10.1073/pnas.2632959100 (2003).
- 20 Kinzebach, S. & Bieback, K. Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal cells under xenogenic-free culture conditions. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **129**, 33-57, doi:10.1007/10_2012_134 (2013).
- 21 Kassem, M., Mosekilde, L. & Eriksen, E. F. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **8**, 1453-1458, doi:10.1002/jbmr.5650081207 (1993).
- 22 Justesen, J., Stenderup, K., Eriksen, E. F. & Kassem, M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcified tissue international* **71**, 36-44, doi:10.1007/s00223-001-2059-x (2002).
- 23 Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. & Yoo, J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* **238**, 265-272, doi:10.1006/excr.1997.3858 (1998).
- 24 Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49, doi:10.1038/nature00870 (2002).

- 25 Sanchez-Ramos, J. *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental neurology* **164**, 247-256, doi:10.1006/exnr.2000.7389 (2000).
- 26 Krampera, M. *et al.* Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* **15**, 1054-1061, doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.010 (2013).
- 27 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
- 28 Heathman, T. R. *et al.* The translation of cell-based therapies: clinical landscape and manufacturing challenges. *Regenerative medicine* **10**, 49-64, doi:10.2217/rme.14.73 (2015).
- 29 Trounson, A., Thakar, R. G., Lomax, G. & Gibbons, D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC medicine* **9**, 52, doi:10.1186/1741-7015-9-52 (2011).
- 30 Duijvestein, M. *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* **59**, 1662-1669, doi:10.1136/gut.2010.215152 (2010).
- 31 Kebriaei, P. *et al.* Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **15**, 804-811, doi:10.1016/j.bbmt.2008.03.012 (2009).
- 32 Wakitani, S. *et al.* Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **10**, 199-206, doi:10.1053/joca.2001.0504 (2002).
- 33 Le Blanc, K. *et al.* Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* **79**, 1607-1614 (2005).
- 34 Strauer, B. E. *et al.* Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* **106**, 1913-1918 (2002).
- 35 Koc, O. N. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone marrow transplantation* **30**, 215-222, doi:10.1038/sj.bmt.1703650 (2002).
- 36 Paek, H. J., Kim, C. & Williams, S. K. Adipose stem cell-based regenerative medicine for reversal of diabetic hyperglycemia.

- World journal of diabetes* **5**, 235-243, doi:10.4239/wjd.v5.i3.235 (2014).
- 37 Davey, G. C., Patil, S. B., O'Loughlin, A. & O'Brien, T. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Frontiers in endocrinology* **5**, 86, doi:10.3389/fendo.2014.00086 (2014).
- 38 Mishra, P. K., Singh, S. R., Joshua, I. G. & Tyagi, S. C. Stem cells as a therapeutic target for diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* **15**, 461-477 (2010).
- 39 Calafiore, R. & Basta, G. Stem cells for the cell and molecular therapy of type 1 diabetes mellitus (T1D): the gap between dream and reality. *American journal of stem cells* **4**, 22-31 (2015).
- 40 Liew, A. & O'Brien, T. The potential of cell-based therapy for diabetes and diabetes-related vascular complications. *Current diabetes reports* **14**, 469, doi:10.1007/s11892-013-0469-6 (2014).
- 41 Soria, B. *et al.* Using stem cells to produce insulin. *Expert opinion on biological therapy* **15**, 1469-1489, doi:10.1517/14712598.2015.1066330 (2015).
- 42 Soria, B. *et al.* Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**, 157-162 (2000).
- 43 Sipione, S., Eshpeter, A., Lyon, J. G., Korbitt, G. S. & Bleackley, R. C. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* **47**, 499-508, doi:10.1007/s00125-004-1349-z (2004).
- 44 Rolletschek, A., Kania, G. & Wobus, A. M. Generation of pancreatic insulin-producing cells from embryonic stem cells - 'proof of principle', but questions still unanswered. *Diabetologia* **49**, 2541-2545, doi:10.1007/s00125-006-0441-y (2006).
- 45 Liu, M. & Han, Z. C. Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**, 1155-1168, doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00288.x (2008).
- 46 Zhang, L. *et al.* Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World journal of gastroenterology : WJG* **11**, 2906-2911 (2005).
- 47 Huang, H. & Tang, X. Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **83**, 539-547 (2003).

- 48 Lin, H. T. *et al.* Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. *World journal of gastroenterology : WJG* **12**, 4529-4535 (2006).
- 49 Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D. & Hussain, M. A. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *The Journal of clinical investigation* **111**, 843-850, doi:10.1172/JCI16502 (2003).
- 50 Chen, L. B., Jiang, X. B. & Yang, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World journal of gastroenterology : WJG* **10**, 3016-3020 (2004).
- 51 Wu, X. H. *et al.* Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World journal of gastroenterology : WJG* **13**, 3342-3349 (2007).
- 52 Oh, S. H. *et al.* Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **84**, 607-617, doi:10.1038/labinvest.3700074 (2004).
- 53 Xie, Q. P. *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Differentiation; research in biological diversity* **77**, 483-491, doi:10.1016/j.diff.2009.01.001 (2009).
- 54 Sun, Y. *et al.* Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chinese medical journal* **120**, 771-776 (2007).
- 55 Timper, K. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and biophysical research communications* **341**, 1135-1140, doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.072 (2006).
- 56 La Rocca, G. *et al.* Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochemistry and cell biology* **131**, 267-282, doi:10.1007/s00418-008-0519-3 (2009).
- 57 Ende, N., Chen, R. & Reddi, A. S. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. *Biochemical and biophysical research communications* **321**, 168-171, doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.121 (2004).

- 58 Mizukami, H. & Yagihashi, S. Exploring a new therapy for diabetic polyneuropathy - the application of stem cell transplantation. *Frontiers in endocrinology* **5**, 45, doi:10.3389/fendo.2014.00045 (2014).
- 59 Sener, L. T. & Albeniz, I. Challenge of Mesenchymal Stem Cells against Diabetic Foot Ulcer. *Current stem cell research & therapy* (2015).
- 60 Kim, B. J., Jin, H. K. & Bae, J. S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve the functioning of neurotrophic factors in a mouse model of diabetic neuropathy. *Laboratory animal research* **27**, 171-176, doi:10.5625/lar.2011.27.2.171 (2011).
- 61 Lee, S. K. *et al.* Dual effect of nitric oxide in immortalized and malignant human oral keratinocytes: induction of apoptosis and differentiation. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* **35**, 352-360, doi:10.1111/j.1600-0714.2006.00439.x (2006).
- 62 Cosby, K. *et al.* Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature medicine* **9**, 1498-1505, doi:10.1038/nm954 (2003).
- 63 Kots, A. Y., Bian, K. & Murad, F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling pathway as a focus for drug development. *Current medicinal chemistry* **18**, 3299-3305 (2011).
- 64 Chu, L. *et al.* Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation. *European journal of pharmacology* **591**, 59-65, doi:10.1016/j.ejphar.2008.06.066 (2008).
- 65 Enikolopov, G., Banerji, J. & Kuzin, B. Nitric oxide and Drosophila development. *Cell death and differentiation* **6**, 956-963 (1999).
- 66 Krumenacker, J. S., Hanafy, K. A. & Murad, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain research bulletin* **62**, 505-515, doi:10.1016/S0361-9230(03)00102-3 (2004).
- 67 Almeida, A., Moncada, S. & Bolanos, J. P. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nature cell biology* **6**, 45-51, doi:10.1038/ncb1080 (2004).
- 68 Krumenacker, J. S. & Murad, F. NO-cGMP signaling in development and stem cells. *Molecular genetics and metabolism* **87**, 311-314, doi:10.1016/j.ymgme.2005.10.009 (2006).
- 69 Mujoo, K., Krumenacker, J. S. & Murad, F. Nitric oxide-cyclic GMP signaling in stem cell differentiation. *Free radical biology &*

- medicine* **51**, 2150-2157, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.037 (2011).
- 70 Brown, G. C. & Cooper, C. E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS letters* **356**, 295-298 (1994).
- 71 Krumenacker, J. S., Katsuki, S., Kots, A. & Murad, F. Differential expression of genes involved in cGMP-dependent nitric oxide signaling in murine embryonic stem (ES) cells and ES cell-derived cardiomyocytes. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **14**, 1-11, doi:10.1016/j.niox.2005.06.010 (2006).
- 72 Mujoo, K., Krumenacker, J. S., Wada, Y. & Murad, F. Differential expression of nitric oxide signaling components in undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem cells and development* **15**, 779-787, doi:10.1089/scd.2006.15.779 (2006).
- 73 Napoli, C. *et al.* Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, 89-95, doi:10.1016/j.jacc.2013.03.070 (2013).
- 74 Wong, J. C. & Fiscus, R. R. Essential roles of the nitric oxide (no)/cGMP/protein kinase G type-Ialpha (PKG-Ialpha) signaling pathway and the atrial natriuretic peptide (ANP)/cGMP/PKG-Ialpha autocrine loop in promoting proliferation and cell survival of OP9 bone marrow stromal cells. *Journal of cellular biochemistry* **112**, 829-839, doi:10.1002/jcb.22981 (2011).
- 75 Hajri, A. *et al.* Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies. *British journal of cancer* **78**, 841-849 (1998).
- 76 Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. & Zeiher, A. M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *The Journal of experimental medicine* **185**, 601-607 (1997).
- 77 Li, J., Bombeck, C. A., Yang, S., Kim, Y. M. & Billiar, T. R. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **274**, 17325-17333 (1999).
- 78 Krischel, V. *et al.* Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* **111**, 286-291, doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00268.x (1998).

- 79 Tejedo, J. R. *et al.* Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival. *Cell death & disease* **1**, e80, doi:10.1038/cddis.2010.57 (2010).
- 80 Mora-Castilla, S. *et al.* Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell death and differentiation* **17**, 1025-1033, doi:10.1038/cdd.2009.204 (2010).
- 81 Kanno, S. *et al.* Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12277-12281, doi:10.1073/pnas.0401557101 (2004).
- 82 Huang, N. F., Fleissner, F., Sun, J. & Cooke, J. P. Role of nitric oxide signaling in endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Stem cells and development* **19**, 1617-1626, doi:10.1089/scd.2009.0417 (2010).
- 83 Shami, P. J. & Weinberg, J. B. Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells. *Blood* **87**, 977-982 (1996).
- 84 Teixeira, C. C., Ischiropoulos, H., Leboy, P. S., Adams, S. L. & Shapiro, I. M. Nitric oxide-nitric oxide synthase regulates key maturational events during chondrocyte terminal differentiation. *Bone* **37**, 37-45, doi:10.1016/j.bone.2005.03.010 (2005).
- 85 Yan, H. *et al.* Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture. *Journal of lipid research* **43**, 2123-2129 (2002).
- 86 Pan, W. *et al.* Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *Journal of cellular biochemistry* **94**, 307-316, doi:10.1002/jcb.20308 (2005).
- 87 Hemish, J., Nakaya, N., Mittal, V. & Enikolopov, G. Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *The Journal of biological chemistry* **278**, 42321-42329, doi:10.1074/jbc.M308192200 (2003).
- 88 Contestabile, A. Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. *Progress in neurobiology* **84**, 317-328, doi:10.1016/j.pneurobio.2008.01.002 (2008).
- 89 Nott, A. & Riccio, A. Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons. *Cell Cycle* **8**, 725-730 (2009).
- 90 Bernstein, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-326, doi:10.1016/j.cell.2006.02.041 (2006).
- 91 Rojas, A. *et al.* Islet cell development. *Advances in experimental medicine and biology* **654**, 59-75, doi:10.1007/978-90-481-3271-3_4 (2010).

- 92 Cornish, E. J., Hassan, S. M., Martin, J. D., Li, S. & Merzdorf, C. S. A microarray screen for direct targets of Zic1 identifies an aquaporin gene, aqp-3b, expressed in the neural folds. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **238**, 1179-1194, doi:10.1002/dvdy.21953 (2009).
- 93 Pan, H. *et al.* A role for Zic1 and Zic2 in Myf5 regulation and somite myogenesis. *Developmental biology* **351**, 120-127, doi:10.1016/j.ydbio.2010.12.037 (2011).
- 94 Grinberg, I. & Millen, K. J. The ZIC gene family in development and disease. *Clinical genetics* **67**, 290-296, doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00418.x (2005).
- 95 Koyabu, Y., Nakata, K., Mizugishi, K., Aruga, J. & Mikoshiba, K. Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins. *The Journal of biological chemistry* **276**, 6889-6892, doi:10.1074/jbc.C000773200 (2001).
- 96 Zhong, J. *et al.* ZIC1 modulates cell-cycle distributions and cell migration through regulation of sonic hedgehog, PI(3)K and MAPK signaling pathways in gastric cancer. *BMC cancer* **12**, 290, doi:10.1186/1471-2407-12-290 (2012).
- 97 Le Blanc, K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **5**, 485-489, doi:10.1080/14653240310003611 (2003).
- 98 Subbanna, P. K. Mesenchymal stem cells for treating GVHD: in-vivo fate and optimal dose. *Medical hypotheses* **69**, 469-470, doi:10.1016/j.mehy.2006.12.016 (2007).
- 99 Sensebe, L. & Bourin, P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation* **87**, S49-53, doi:10.1097/TP.0b013e3181a28635 (2009).
- 100 Gottipamula, S., Muttigi, M. S., Kolkundkar, U. & Seetharam, R. N. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. *Cell proliferation* **46**, 608-627, doi:10.1111/cpr.12063 (2013).
- 101 Wessman, S. J. & Levings, R. L. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Developments in biological standardization* **99**, 3-8 (1999).
- 102 Parker, A., Shang, H., Khurgel, M. & Katz, A. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy* **9**, 637-646, doi:10.1080/14653240701508452 (2007).
- 103 Jayme, D. W. & Smith, S. R. Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture. *Cytotechnology* **33**, 27-36, doi:10.1023/A:1008133717035 (2000).

- 104 Yao, S. *et al.* Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6907-6912, doi:10.1073/pnas.0602280103 (2006).
- 105 Ng, F. *et al.* PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* **112**, 295-307, doi:10.1182/blood-2007-07-103697 (2008).
- 106 Agata, H. *et al.* Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochemical and biophysical research communications* **382**, 353-358, doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.023 (2009).
- 107 Chase, L. G., Lakshmipathy, U., Solchaga, L. A., Rao, M. S. & Vemuri, M. C. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy* **1**, 8, doi:10.1186/scrt8 (2010).
- 108 Tarle, S. A., Shi, S. & Kaigler, D. Development of a serum-free system to expand dental-derived stem cells: PDLSCs and SHEDs. *Journal of cellular physiology* **226**, 66-73, doi:10.1002/jcp.22304 (2011).
- 109 Hartmann, I. *et al.* Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. *Journal of immunological methods* **363**, 80-89, doi:10.1016/j.jim.2010.10.008 (2010).
- 110 Hudson, J. E. *et al.* A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem cells and development* **20**, 77-87, doi:10.1089/scd.2009.0497 (2011).
- 111 Chen, A. K., Reuveny, S. & Oh, S. K. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. *Biotechnology advances* **31**, 1032-1046, doi:10.1016/j.biotechadv.2013.03.006 (2013).
- 112 Santos, F. *et al.* Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue engineering. Part C, Methods* **17**, 1201-1210, doi:10.1089/ten.tec.2011.0255 (2011).

- 113 Martin, I., Wendt, D. & Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology* **22**, 80-86, doi:10.1016/j.tibtech.2003.12.001 (2004).
- 114 dos Santos, F. F., Andrade, P. Z., da Silva, C. L. & Cabral, J. M. Bioreactor design for clinical-grade expansion of stem cells. *Biotechnology journal* **8**, 644-654, doi:10.1002/biot.201200373 (2013).
- 115 Rafiq, Q. A., Brosnan, K. M., Coopman, K., Nienow, A. W. & Hewitt, C. J. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology letters* **35**, 1233-1245, doi:10.1007/s10529-013-1211-9 (2013).
- 116 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45 (2001).
- 117 Aruga, J. *et al.* The mouse zic gene family. Homologues of the Drosophila pair-rule gene odd-paired. *The Journal of biological chemistry* **271**, 1043-1047 (1996).
- 118 Nakata, K., Koyabu, Y., Aruga, J. & Mikoshiba, K. A novel member of the Xenopus Zic family, Zic5, mediates neural crest development. *Mechanisms of development* **99**, 83-91 (2000).
- 119 Kuo, J. S. *et al.* Opl: a zinc finger protein that regulates neural determination and patterning in Xenopus. *Development* **125**, 2867-2882 (1998).
- 120 Aruga, J. *et al.* Mouse Zic1 is involved in cerebellar development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 284-293 (1998).
- 121 Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J. & Mikoshiba, K. Xenopus Zic family and its role in neural and neural crest development. *Mechanisms of development* **75**, 43-51 (1998).
- 122 Grinblat, Y. & Sive, H. zic Gene expression marks anteroposterior pattern in the presumptive neurectoderm of the zebrafish gastrula. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **222**, 688-693, doi:10.1002/dvdy.1221 (2001).
- 123 Sasai, N., Mizuseki, K. & Sasai, Y. Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in Xenopus. *Development* **128**, 2525-2536 (2001).
- 124 Aruga, J., Inoue, T., Hoshino, J. & Mikoshiba, K. Zic2 controls cerebellar development in cooperation with Zic1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 218-225 (2002).
- 125 Nagai, T. *et al.* The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern

- formation. *Developmental biology* **182**, 299-313, doi:10.1006/dbio.1996.8449 (1997).
- 126 Rohr, K. B., Schulte-Merker, S. & Tautz, D. Zebrafish *zic1* expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling. *Mechanisms of development* **85**, 147-159 (1999).
- 127 Fujimi, T. J., Mikoshiba, K. & Aruga, J. Xenopus *Zic4*: conservation and diversification of expression profiles and protein function among the Xenopus *Zic* family. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 3379-3386, doi:10.1002/dvdy.20906 (2006).
- 128 de Mestre, A. M. *et al.* Early growth response gene 1 (EGR1) regulates heparanase gene transcription in tumor cells. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35136-35147, doi:10.1074/jbc.M503414200 (2005).
- 129 Yu, J., de Belle, I., Liang, H. & Adamson, E. D. Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses. *Molecular cell* **15**, 83-94, doi:10.1016/j.molcel.2004.06.030 (2004).
- 130 Choudhry, Z. *et al.* Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Annals of neurosciences* **21**, 28-31, doi:10.5214/ans.0972.7531.210109 (2014).
- 131 Rodova, M., Fu, J., Watkins, D. N., Srivastava, R. K. & Shankar, S. Sonic hedgehog signaling inhibition provides opportunities for targeted therapy by sulforaphane in regulating pancreatic cancer stem cell self-renewal. *PloS one* **7**, e46083, doi:10.1371/journal.pone.0046083 (2012).
- 132 Mizugishi, K., Aruga, J., Nakata, K. & Mikoshiba, K. Molecular properties of *Zic* proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. *The Journal of biological chemistry* **276**, 2180-2188, doi:10.1074/jbc.M004430200 (2001).
- 133 Hui, C. C. & Angers, S. Gli proteins in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 513-537, doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154048 (2011).
- 134 Ghanbari, A. *et al.* Sonic hedgehog inhibition induces mouse embryonic stem cells to differentiate toward definitive endoderm. *Indian journal of experimental biology* **51**, 201-207 (2013).
- 135 Brill, E. *et al.* ZIC1 overexpression is oncogenic in liposarcoma. *Cancer research* **70**, 6891-6901, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0745 (2010).
- 136 Yokota, N. *et al.* Predominant expression of human *zic* in cerebellar granule cell lineage and medulloblastoma. *Cancer research* **56**, 377-383 (1996).

- 137 Wong, Y. F. *et al.* Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. *Oncogene* **26**, 1971-1982, doi:10.1038/sj.onc.1209986 (2007).
- 138 Gan, L. *et al.* ZIC1 is downregulated through promoter hypermethylation, and functions as a tumor suppressor gene in colorectal cancer. *PloS one* **6**, e16916, doi:10.1371/journal.pone.0016916 (2011).
- 139 Wang, L. J. *et al.* ZIC1 is downregulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Biochemical and biophysical research communications* **379**, 959-963, doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.180 (2009).
- 140 Merzdorf, C. S. Emerging roles for zic genes in early development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **236**, 922-940, doi:10.1002/dvdy.21098 (2007).
- 141 Aruga, J. The role of Zic genes in neural development. *Molecular and cellular neurosciences* **26**, 205-221, doi:10.1016/j.mcn.2004.01.004 (2004).
- 142 Chase, L. G. *et al.* Development and characterization of a clinically compliant xeno-free culture medium in good manufacturing practice for human multipotent mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine* **1**, 750-758, doi:10.5966/sctm.2012-0072 (2012).
- 143 Ishikawa, I. *et al.* [Effectivity of the novel serum-free medium STK2 for proliferating human mesenchymal stem cells]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **129**, 381-384 (2009).
- 144 Janz Fde, L. *et al.* Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**, 649353, doi:10.1155/2012/649353 (2012).
- 145 Naaldijk, Y., Staude, M., Fedorova, V. & Stolzing, A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC biotechnology* **12**, 49, doi:10.1186/1472-6750-12-49 (2012).
- 146 Al-Saqi, S. H. *et al.* Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell and tissue banking* **16**, 181-193, doi:10.1007/s10561-014-9463-8 (2015).
- 147 Skog, M. *et al.* Xeno-free chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stromal cells: towards clinical-grade chondrocyte

- production. *Cytotechnology*, doi:10.1007/s10616-014-9721-4 (2014).
- 148 Iwamoto, T. *et al.* Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. *Cell and tissue research* **351**, 487-495, doi:10.1007/s00441-012-1528-z (2013).
- 149 Jung, S., Sen, A., Rosenberg, L. & Behie, L. A. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **12**, 637-657, doi:10.3109/14653249.2010.495113 (2010).
- 150 Manton, K. J. *et al.* A chimeric vitronectin: IGF-I protein supports feeder-cell-free and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Stem cells and development* **19**, 1297-1305, doi:10.1089/scd.2009.0504 (2010).
- 151 Heng, B. C. *et al.* Translating human embryonic stem cells from 2-dimensional to 3-dimensional cultures in a defined medium on laminin- and vitronectin-coated surfaces. *Stem cells and development* **21**, 1701-1715, doi:10.1089/scd.2011.0509 (2012).
- 152 Kaini, R. R., Shen-Gunther, J., Cleland, J. M., Greene, W. A. & Wang, H. C. Recombinant Xeno-Free Vitronectin Supports Self-Renewal and Pluripotency in Protein-Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue engineering. Part C, Methods*, doi:10.1089/ten.TEC.2015.0180 (2016).
- 153 Chen, G. *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature methods* **8**, 424-429, doi:10.1038/nmeth.1593 (2011).
- 154 Suda, T. & Dexter, T. M. Effect of hydrocortisone on long-term human marrow cultures. *British journal of haematology* **48**, 661-664 (1981).
- 155 Gronthos, S. & Simmons, P. J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* **85**, 929-940 (1995).
- 156 Storm, M. P., Orchard, C. B., Bone, H. K., Chaudhuri, J. B. & Welham, M. J. Three-dimensional culture systems for the expansion of pluripotent embryonic stem cells. *Biotechnology and bioengineering* **107**, 683-695, doi:10.1002/bit.22850 (2010).
- 157 Hewitt, C. J. *et al.* Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnology letters* **33**, 2325-2335, doi:10.1007/s10529-011-0695-4 (2011).
- 158 Frauenschuh, S. *et al.* A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. *Biotechnology progress* **23**, 187-193, doi:10.1021/bp060155w (2007).

- 159 Sart, S., Schneider, Y. J. & Agathos, S. N. Influence of culture parameters on ear mesenchymal stem cells expanded on microcarriers. *Journal of biotechnology* **150**, 149-160, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.08.003 (2010).
- 160 Schop, D. *et al.* Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **4**, 131-140, doi:10.1002/term.224 (2010).
- 161 Goh, T. K. *et al.* Microcarrier culture for efficient expansion and osteogenic differentiation of human fetal mesenchymal stem cells. *BioResearch open access* **2**, 84-97, doi:10.1089/biores.2013.0001 (2013).
- 162 Heathman, T. R. *et al.* Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process. *Biotechnology and bioengineering* **112**, 1696-1707, doi:10.1002/bit.25582 (2015).

8. Publicaciones

Los resultados de esta tesis han sido descritos y revisados en las siguientes publicaciones:

1. Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Caballano-Infantes E, Salguero-Aranda C, **Beltran-Povea** A, Hitos AB, Hmadcha A, Martin F, Soria B, Bedoya FJ, Tejedo JR. Nitric Oxide Prevents Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation through Regulation of Gene Expression, Cell Signaling and Control of Cell Proliferation. *J Cell Biochem*. 2016 Feb 8. doi: 10.1002/jcb.25513.
2. **Beltran-Povea** A, Caballano-Infantes E, Salguero-Aranda C, Martín F, Soria B, Bedoya FJ, Tejedo JR, Cahuana GM. Role of nitric oxide in the maintenance of pluripotency and regulation of the hypoxia response in stem cells. *World J Stem Cells*. 2015 Apr 26;7(3):605-17. doi: 10.4252/wjsc.v7.i3.605. Review.
3. **Beltrán-Povea** A, Salguero-Aranda C, Tapia-Limonchi R, Caballano-Infante E, Hitos AB, Diaz I, Cahuana GM, Martin F, Soria B, Bedoya FJ, Tejedo JR. The EGR-1 dual role on gene regulation in early differentiation induced by Nitric Oxide in mouse Embryonic Stem Cells. Manuscrito en preparación.
4. **Beltran-Povea** A, Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Soria B, Bedoya FJ, Tejedo JR. Chemically Defined Culture Media for the Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. Manuscrito en preparación.

5. Patente

- Inventores: (*p. o. de firma*): Soria B; Tejedo, JR; Bedoya, FJ; Gladys M. Cahuana; Hmadcha, Abdelkrim; Tapia-Limonchi R, **Amparo Beltran Povea**; Berta Rodriguez.
- Título: "Cell Culture Medium for human Progenitor Cells (hPC)".
- N de solicitud: EP15382417.
- País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 08 de Septiembre 2015.
- Entidad titular: Fundación Progreso y Salud, Universidad Pablo de Olavide , NewBiotech.

ANEXO: OLIGONUCLEÓTIDOS	
Zic1 ratón	F: GGGCAGATGCGGCTAGGTTTC R: TCTTGCTTGATGGGTGGCGCATATAG
Egr1 ratón	F: AACAAACCCTATGAGCACCTGACCA R: AGTCGTTTGGCTGGGATAACTCGT
Pdx1 ratón	F AGCTCCCTTTCCCGTGGATGAA R: TAGGCAGTACGGGTCCTCTTGT
Gli1 ratón	F: AGTGAGCCATGCTGTCTCCGA R: AATTTGACTGAACTCCGAGGAGGAGGA
Gli2 ratón	F: AGACACCAGGAGGGAAGGTACCATTAT R: ACAGACCGGAGGTAGTGCTCCATA
Gli3 ratón	F: GAGCCCTCGACGTCTAGTGATGAG R: TGGCATCAATTGGTACAGGAGGATGG
Patched ratón	F: CCTGTTACCGTCACCCAGGACAA R: TGGGTTTCAGGAGGAAAGGAGCATAG
Nanog ratón	F: AGCAGATGCAAGAACTCTCCTCCA R: CCGCTTGCACTTCATCCTTTGGTT
Oct4 ratón	F: AGCTGCTGAAGCAGAAGAGGATCA R: AACACCTTTCCAAAGAGAACGCCC
β actina ratón	F: GGAATCCTGTGGCATCCATGAAATACA R: ACCAGACAGCACTGTGTTGGCATA
Zic1 chip (Isla1) ratón	F: TTCCTCCTCCTCCTGATCTTCCCT R: CGTCGGCGAACGGGTTGATA
Nanog humano	F: CCCAAAGGCAACAACCCACT R: AGCTGGGTGGAAGAGAACACA
Oct4 humano	F: TATGCAAAGCAGAAACCCTCG R: TTCGGGCACTGCAGGAACAAA
α 6-integrin humano	F: AAG GCT CCT GTT TTG CAC AG R: ATG TAA GTC AGC CAC GCC A
FGF2 humano	F: CGC TGT ACT GCA AAA ACG GGG

	R: CCG AGT TGT AGC TTG ATG TGA GGG T
Rex1 humano	F: CAGATCCTAAACAGCTCGCAG R: GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA
β Actina humano	F: CGTACCACTGGCATCGTGAT R: TTCTCCTTAATGTCACGCAC
CD105 CMMh	F:CACTAGCCAGGTCTCGAAGG R:CTGAGGACCAGAAGCACCTC
CD73 CMMh	F:CGCAACAATGGCACAATTAC R:CAGGTTTTTCGGGAAAGATCA
CD90 CMMh	F:TCGCTCTCCTGCTAACAGTCT R:CTCGTACTGGATGGGTGAACT
CD45 CMMh	F: CTGCATTCTCACCCGCAAGC R: CCGCTGAATGTCTGCGTGTC
CD34 CMMh	F: CAAGAATCCCCCACCCTCT R: TGGGGTAGCAGTACCGTTGT
CD14 CMMh	F: TCCTTCCTGTTACGGTCCCC R: GAACCTCTGAGCTCCGGACA